Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h. c. H. E. Bock

Experimentelle Untersuchungen über die Verwendbarkeit der 20 -Hydroxysteroiddehydrogenase zur Bestimmung der 20-Ketosteroide im Harn

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Bernd Wegler
aus Stetten/Kreis Waiblingen

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547609_0018

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h. c. H. E. Bock

Experimentelle Untersuchungen über die Verwendbarkeit der 20 -Hydroxysteroiddehydrogenase zur Bestimmung der 20-Ketosteroide im Harn

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Bernd Wegler
aus Stetten/Kreis Waiblingen

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. J. Hirschmann

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Eggstein
2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. h.c. H.E. Bock

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG • Tübingen

Meinen Eltern in Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. Chemische Natur der im Urin ausgeschiedenen 20-Ketosteroide 1

II. Bestimmungsmethoden der C21Steroide im Harn 6

1. Physikalische Verfahren 6

A. Colorimetrie 6

a) Methode nach Porter-Silber 6
b) Methode nach Glenn und Nelson 7
c) Bei Oertel beschriebene Methoden 7
d) Oxydatives Verfahren nach Daughaday 7

B. Ultrarotspektrographie und Ultraviolettspektrographie 7

C. Fluorimetrie 8

D. Gaschromatographie 8

2. Chemische Verfahren 9

A. Enzymatische Methoden 9

a) Die 20ß-Hydroxysteroiddehydrogenase 9

aα) Allgemeines über die 20ß-STDH 9
aβ) Chemische Eigenschaften der 20ß-STDH 10
aγ) Physikalische Eigenschaften der 20ß-STDH 11

b) Methoden zur Bestimmung der 20-Ketosteroide mit der 20ß-STDH 12

bα) Methode nach Hübener und Sahrholz 12
bβ) Methode nach W.Rick 12
bγ) Methode nach Hübener et al. 12
bδ) Methode nach Margraf et al. 13
bε) Ermittlung von ΔE 14

c) Kinetik der enzymatischen Reaktion mit der 20ß-STDH 16

d) Zusammenfassung 21

III. Direkte Bestimmung der 20-Ketosteroide im Harn mit der 20ß-STDH 23

1. Bedingungen für die enzymatische Hydrolyse der Steroidkonjugate 23

A. Prinzip 23

Aa) Physikalische und chemische Eigenschaften der ß-Glucuronidase/Arylsulfatase (= GRD/ARS) 24

B. Versuche 24

a) Allgemeines 24
b) Durchführung der Versuche 25
c) Zusammenfassung der Ergebnisse 36

2. Vereinfachung der Extraktionsmethode nach Margraf et al. durch direkte Bestimmung der 20-Ketosteroide im Harn 37

A. Prinzip 37

B. Eigene Untersuchungen 38

a) Versuche 38
b) Beschreibung der Methode 43
c) Prüfung der Methode auf ihre Zuverlässigkeit 45

cα) Nachweis der Richtigkeit der Methode 45
cβ) Spezifität der Methode 49
cγ) Genauigkeit, Wiederholbarkeit der Methode 50
cδ) Empfindlichkeit der Methode 51

d) Methodische Ergänzungen 51
e) Berücksichtigung der zur pH-Einstellung zugeführten Mengen und der Molekulargewichte der Steroide bei der Berechnung 52

IV. Zusammenfassung 55

V. Literaturangaben 57

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE VERWENDBARKEIT DER 20ß- HYDROCYSTEROIDDEHYDROGENASE ZUR BESTIMMUNG DER 20- KETOSTEROIDE IM HARN

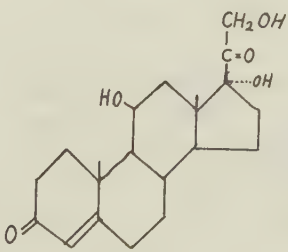
I. CHEMISCHE NATUR DER IM URIN AUSGESCHIEDENEN 20-KETOSTEROIDE

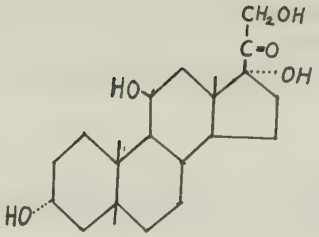
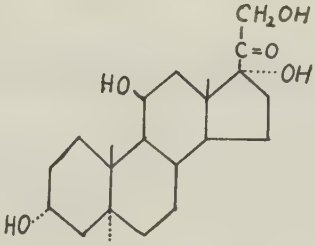
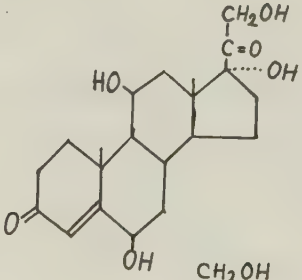
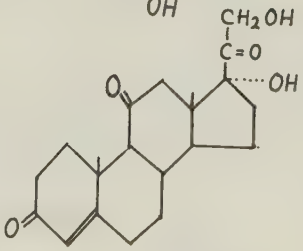
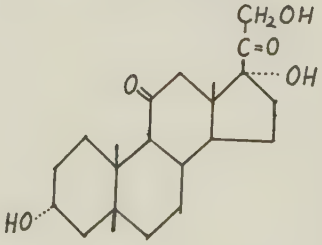
Die 20-Ketosteroide, die im Harn ausgeschieden werden, repräsentieren einen grossen Teil der in der Nebennierenrinde gebildeten Hormone.

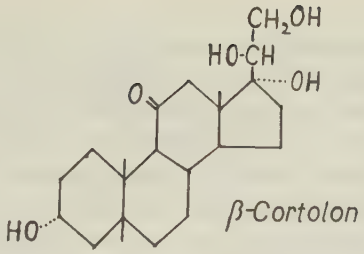
Im wesentlichen handelt es sich um Cortisol, Tetrahydrocortisol, Allotetrahydrocortisol, Cortison, Tetrahydrocortison, Corticosteron, Tetrahydrocorticosteron, Allotetrahydrocorticosteron und in 100 bis 1000 fach kleineren Mengen um Aldosteron und Tetrahydroaldosteron.

Die chemische Konstitution dieser Verbindungen und ihr Vorkommen im Harn endocrinologisch normaler Personen kann der Tabelle von Tamm [1] entnommen werden.

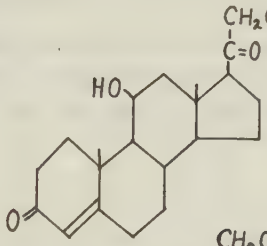
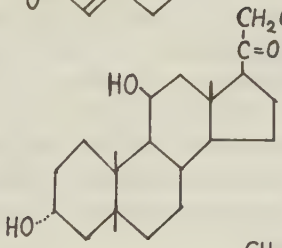
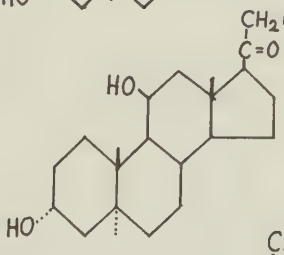
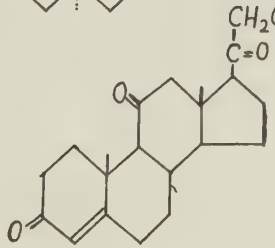
a) Die Ausscheidung von Cortisol und seiner Metaboliten im Urin in mg/24 Stunden.

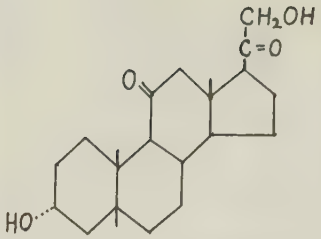
Name	Formel	Mittelwert	Schwankung
Cortisol = F		0,07	0,03-0,09

Tetrahydro-cortisol • THF		♂ 2,2 ♀ 1,9	♂ 0,8-2,8 ♀ 0,5-3,7
Allotetra-hydrocor-tisol =allo THF		♂ 0,8 ♀ 1,4	♂ ♀ 0-2,8
6β-OH-Cortisol		♂ 0,44 ♀ 0,37	♂ 0,31-0,51 ♀ 0,18-0,76
Cortison = E		0,09	0,06-0,14
Tetrahydro-cortison = THE		3,81	1,6-8,3

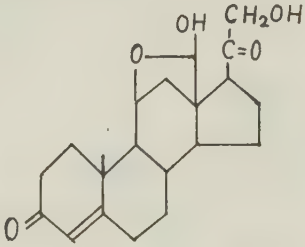
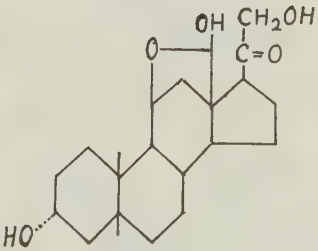
α-und β-Cortolon	 β-Cortolon	♂ 1,9 ♀ 1,1	♂ 0,3-2,9 ♀ 0,5-1,6

b) Die Ausscheidung von Corticosteron und seiner Metaboliten im Urin in mg/24 Stunden.

Name	Formel	Mittelwert	Schwankung
Corticosteron = B		0,02	0-0,04
Tetrahydrocorticosteron = THB		0,2	0,1-0,36
Allotetrahydrocorticosteron = allo THB		0,2	0,08-0,36
11-Dehydrocorticosteron		0,01	0-0,03

Tetrahydro-11-dehydro-corticosteron		0,16	0,06–0,24

c) Die Ausscheidung von Aldosteron und seiner Metaboliten im Urin in µg/24 Stunden.

Name	Formel	Mittelwert	Schwankung
Aldosteron			0,17-0,63
3-oxo-Konjugat		7,8	3,6–15,2
Tetrahydro-aldosteron			40–60

Die meisten der ausgeschiedenen 20-Ketosteroide sind biologisch weitgehend unwirksame Tetrahydroverbindungen. Ein Teil der in der Nebennierenrinde gebildeten 20-Ketosteroide wird zu 20ß-Hydroxysteroiden reduziert [3]. Sie können, z.B. die Cortole und Cortolone, die aus den Tetrahydroderivaten von F und E durch weitere Hydrierung am C-Atom 20 gebildet werden [2], bei dem angestrebten Analysenverfahren nicht mit erfasst werden. Auch das Progesteron, ein sehr wichtiges 20-Ketosteroid, das nur zum Teil in der Nebennierenrinde gebildet wird, kann nicht bestimmt werden, da es fast ausschliesslich als Pregmandiolglucuronid im Harn erscheint.

Im Harn liegen die Steroide hauptsächlich als gut wasserlösliche Ester der Glucuronsäure und der Schwefelsäure vor, wobei nur geringe Mengen des Cortisols, Corticosterons, Cortisons und Aldosterons nicht verestert ausgeschieden werden [1].

Aus der Tabelle nach Tamm ist ersichtlich, dass die 20-Ketosteroide sowohl die mit der Porter-Silber Methode erfassten 17-Hydroxysteroide weitgehend einschließen, als auch das Corticosteron und Aldosteron mit deren Derivaten. Ein Analysenverfahren, das die 20-Ketogruppe bestimmt, würde somit die meisten Steroide, die in der Nebennierenrinde gebildet werden und ihre Metaboliten, erfassen.

II. BESTIMMUNGSMETHODEN DER C 21-STEROIDE IM HARN

Hormonbestimmungsverfahren bestehen im allgemeinen aus zwei Arbeitsgängen:
Mit Hilfe von geeigneten Reinigungs- und Anreicherungsverfahren wird die zu untersuchende Probe vorbehandelt; daran schliesst sich dann ein quantitativer Nachweis an.
Voraussetzung für das Gelingen einer Hormonbestimmung ist somit die quantitative Vorreinigung. Dafür stehen im Prinzip folgende Verfahren zur Verfügung:

a) Verteilung zwischen verschiedenen, nicht miteinander mischbaren Lösungsmitteln.
b) Chromatographische Trennung mit
   b1) Papierchromatographie
   b2) Dünnschichtchromatographie
   b3) Säulenchromatographie
   b4) Gaschromatographie.

Auf diese quantitative Vorreinigung folgt dann die Mengenbestimmung mit einem hormonspezifischen Nachweisverfahren.

Die gebräuchlichen Verfahren zur Mengenbestimmung sind chemischer oder physikalischer Natur, wobei die physikalischen Methoden im klinischen Labor bei weitem die grössere Bedeutung erlangt haben.

1.) Physikalische Verfahren

A) Colorimetrie

Aa) Eine der gebräuchlichsten und für die klinische Routinediagnostik geeignetsten Methoden, ist die Bestimmung der 17-Hydroxycorticosteroide nach Porter-Silber [4), 5)]. Sie gibt einen guten Aufschluss über die Funktion der Nebennierenrinde.

Prinzip der Reaktion: Durch Umwandlung der Dihydroxyacetonseitenkette entsteht ein 17-desoxy - 20 oxo - 21 Aldehyd, der mit Phenylhydrazin an der C 21 - Aldehydgruppe ein Hydrazon bildet und eine typische Farbreaktion mit Extinktionsmaximum bei 410 mμ liefert.
Der Mechanismus der Reaktion ist aufgeklärt [6], sie ist aber nicht voll spezifisch [6, 1].

Ab) Das Verfahren nach Glenn und Nelson [7] ist dem nach Porter-Silber im Prinzip ähnlich, die Hydrolyse mit ß-Glucuronidase ist aber durch die Einbeziehung von Absorptionschromatographie an Florisilsäulen bei der Vorreinigung spezifischer als dieses.Es werden dabei 17-Hydroxy - 20, 21 - Ketole bestimmt.

Ac) Oertel [8] erwähnt noch weitere Verfahren, bei denen im wesentlichen die gleichen Substrate bestimmt werden wie bei den beiden vorigen Methoden. Sie stellen im Prinzip auch nur Modifikationen der Methode nach Porter-Silber [4], [5] dar, so dass hier nicht darauf eingegangen werden soll.

Ad) Zimmermann [9] erwähnt noch ein oxidatives Verfahren nach Daughaday [10] mit Formaldehydabspaltung und dessen anschliessender Bestimmung.

B) Ultrarotspektrographie und Ultraviolettspektrographie [9], [11], [12]

ImWellenbereich des Lichts von 7,4μ - 14μ sind die Absorptionskurven für jedes Steroid so charakteristisch, dass man die jeweils vorliegende Verbindung "wie einen Menschen an seinem Fingerabdruck ('finger print') erkennen kann", da es anhand von Verschiebungen im Absorptionsmaximum möglich ist, zu sagen, an welchem C-Atom die Ketogruppe sitzt.

Die Ultrarotspektrographie ist für die Identifizierung von Steroiden aus Körperflüssigkeiten nach eingehender Vorreinigung und chromatographischer Trennung sehr gut geeignet.

Zur Ultraviolettspektrographie ist ebenfalls vorher eine chromatographische Auftrennung der Steroide notwendig. Es hat sich als geeignet erwiesen, schwach absorbierende Ketosteroide zuerst chemisch in Derivate mit starker UV-Absorption überzuführen [9), 13)].

Prinzipiell ähnlich zur Ultrarotspektrographie erfolgt dann der Nachweis der einzelnen C21-Steroide durch spezifische Absorptionsbanden.

Der Vorteil dieser Methoden ist ihre grosse Spezifität, der Nachteil ihr notwendiger Zeitaufwand für die Vorbereitung und die grosse Erfahrung, die sie verlangen.

C) Fluorimetrie

Auch zahlreiche fluorimetrische Methoden sind bekannt (erwähnt bei Braunsberg 14)). Diese Verfahren beeindrucken durch ihre grosse Empfindlichkeit, sind aber noch mit mangelnder Spezifität behaftet. Ausserdem verlangen sie einen grossen Aufwand bei der Reinigung der Extrakte und sind überaus langwierig.

D) Gaschromatographie

Die gaschromatographische Bestimmung einzelner C 21-Steroide nach vorheriger Extraktion und Reinigung ist kompliziert. Hier wird zusätzlich noch ein grösserer apparativer Aufwand notwendig.

Beim gaschromatographischen Analyseverfahren kommen als Nachweisverfahren die Messung im Wärmeleitfähigkeitsdetektor oder im Flammenionisationsdetektor zur Anwendung.

J. Chamberlain [15] gibt eine geeignete Methode zur gaschromatographischen Bestimmung sämtlicher 20-Ketosteroide an.

2.) Chemische Verfahren

Hier spielt im wesentlichen nur die enzymatische Analyse eine Rolle.

Es handelt sich dabei im strengen Sinne auch um ein physikalisches Verfahren, da der indirekte Nachweis der bei der Reaktion entstandenen Produkte mit Hilfe der Photometrie erfolgt.

A) Enzymatische Methoden

a) Die 20ß-Hydroxysteroiddehydrogenase

Hier muss zunächst einiges Grundsätzliches zu der 20ß-Hydroxysteroiddehydrogenase (20ß-STDH) gesagt werden, dem Ferment, das eine enzymatische Analyse der 20-Ketosteroide erst gestattet.

a) Allgemeines über die 20ß-Hydroxysteroiddehydrogenase

Die 20-Hydroxysteroiddehydrogenasen gehören zu den bedeutendsten steroidinaktivierenden Enzymen des tierischen Organismus [16]. Baillie et al. [17] fanden 20ß-STDH-Aktivität in menschlichen Leydigzellen und bei der Maus in Testes,

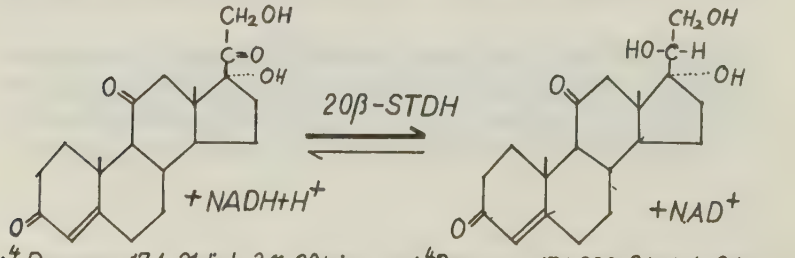
Zona fasciculta der Nebennierenrinde und Theca interna des Ovars. In der Rattenleber, in der die 20α-STDH und 20ß-STDH auch vorkommen, sind die Enzyme in den Mikrosomen der Zelle lokalisiert [18].

Die tierischen Enzyme haben eine geringe Wechselzahl und sind fest an die Zellstrukturen gebunden. Daher wendeteman sich zur Gewinnung der Hydroxysteroiddehydrogenasen den Mikroorganismen zu, wo dies einfacher ist [16]. Dort sind sie besser löslich, und vor allem kann der Enzymgehalt der Mikroorganismen durch Induktion gesteigert werden [19], [20].

1958 fanden Lindner et al.[21], dass Streptomyces hydrogenans 20-Ketosteroide zu 20ß-Hydroxysteroiden umsetzt, und dass durch $\Delta^{4,17(20)}$ - Pregnadien - 11 ß, 21 diol - 3 on, das keine 20-Ketogruppe besitzt und deshalb nicht umgesetzt wird, eine 20ß - STDH induziert werden kann. Es erfolgt so eine Steigerung des Gehaltes um das 20-fache [19] [20].
H.J. Hübener et al. isolierten das Enzym aus dem Mycel [19], [22] und kristallisierten die 20ß-STDH [16], [23], [24], [25]. Diese Methode der Darstellung wurde auch bei der industriellen Herstellung des Enzympräparates von Boehringer Mannheim, 20ß - STDH, verwendet.

a) Chemische Eigenschaften der 20ß-STDH

Die Reduktion der 20-Ketosteroide zu 20ß-Hydroxysteroiden verläuft einheitlich in Gegenwart von NADH + H^+ [26]. Die Reaktion ist spezifisch für C21-Steroide hinsichtlich des sterischen Verlaufs der Reduktion in ß-Stellung [26].
Die Reaktion läuft nach folgendem Schema ab:



Δ^4 Pregnen-17α,21diol-3,11,20trion ⇌ Δ^4Pregnen-17α,20ß,21triol-3,11dion
(Cortison)

Eine gewisse Unspezifität zeigt das Enzym gegenüber verschiedenen C19-Steroiden wie: 5α -Androstan - 17ß - ol - 3on (= Dihydrotestosteron) - Reduktion der 3-on-Gruppe mit $NADH+H^+$ -; 5α -Androstan - 3α ol - 17 on (= Androsteron) - Oxidation der 3-α -ol-Gruppe mit NAD^+ -.

Δ^5 Andosten - 3ß ol - 17 on (= Dehydroepiandrosteron) und Δ^4 - Androsten - 3ß, 17ß - diol reagieren nur sehr langsam; Δ^4-Androsten - 17ß ol - 3 on (= Testosteron) reagiert nicht [26].

Weiterhin zeigt J. Schmidt-Thomé [26], dass das Gleichgewicht der Reaktion zu 99 % auf der Seite der Hydrierung liegt. Eine Möglichkeit der Rückreaktion gibt Hübener [25] an.

Die 20ß-STDH ist fast ganz unempfindlich gegenüber $NADPH+H^+$. Hauptsächlich reagiert sie mit $NADH+H^+$ [26].
Aus der Arbeit von J. Schmidt-Thomé [26] ist weiter zu entnehmen, dass sterische Änderungen am Molekül eine Rolle bei der Umsetzgeschwindigkeit spielen und dass auch Veränderungen an den Substituenten am Ring diese wesentlich beeinflussen.
Zu diesem Problem wurden einige Versuche unternommen, deren Ergebnisse eine wesentliche Einschränkung in der Anwendung der 20ß-STDH erbringen sollten. Darauf soll am Ende dieses Kapitels unter d) eingegangen werden.

Veresterungen am C-Atom 21 verhindern die enzymatische Reaktion mit der 20ß - STDH [27]. Dies zeigt deutlich die Notwendigkeit einer möglichst weitgehenden Hydrolyse.

aγ) Physikalische Eigenschaften der 20ß-STDH

Die physikalischen Eigenschaften der 20ß-STDH sind von Hübener angegeben worden [25].

Molekulargewicht: 93.000
pH Optimum bei 25°C: pH = 6,4
Wechselzahl bei 25°C und pH 7,3: WZ = 1860 Mole Cortison/min. $9{,}3 \cdot 10^4$ g Protein.

In derselben Arbeit sind auch die verschiedenen Michaeliskonstanten angegeben.

b) Methoden zur Bestimmung der 20-Ketosteroide mit der 20ß-STDH

Im folgenden sollen nun einige Methoden zur Bestimmung der 20-Ketosteroide mit der 20ß-STDH aufgeführt werden. Anfänglich wurden diese Methoden nur im Plasma und im Gewebe angewandt. Erst später erfolgte eine Bestimmung im Harn.

bα) Hübener und Sahrholz [28] beschrieben als erste eine brauchbare Methode zur Bestimmung von 20-Ketosteroiden im Blutplasma und in Geweben: Nach Extraktion und Eindampfen wird der Trockenrückstand in einem Gemisch aus Glycerin (als Lösungsvermittler), Cyclohexan und einem organischen Puffer gelöst. Dann erfolgt nach Zugabe des Enzyms die photometrische Messung des Extinktionsabfalls bei 344 mμ, der durch die Oxidation des zugesetzten $NADH+H^+$ entsteht.

bβ) Nach W. Rick (in H.U. Bergmeyer [25]) kann die Methode durch fluorimetrische NAD^+ - Messung an Empfindlichkeit wesentlich gesteigert werden und erfordert dadurch geringe Mengen an Blutplasma. Die methodische Aufarbeitung der Probe geschieht ähnlich wie bei Hübener [28].

bγ) Henning et al. [29] geben eine Methode zur mikrochemischen Bestimmung von Steroiden nach Extraktion aus Blutplasma oder Geweben an. Dabei werden mit Hilfe

der 20ß-STDH ähnlich polare Verbindungen getrennt (durch Reduktion der 20-Ketogruppe in die 20ß-Hydroxygruppe) und in chromatographisch besser unterscheidbare Verbindungen überführt; oder wenig polare Verbindungen werden in polare Reaktionsprodukte verwandelt und ergeben so eine andere Beweglichkeit bei der chromatographischen Auftrennung. Diese Methode eignet sich somit besonders zur Bestimmung einzelner Steroide aus der 20-Ketogruppe.

b δ) Vor allem für die Bestimmung der 20-Ketosteroide im Harn, aber auch im Gesamtblut und im Plasma entwickelten Margraf et al.[27] eine Methode, auf die im folgenden näher eingegangen werden muss:
Der Ansatz von 5 ml Urin wird mit 40 % Schwefelsäure auf pH = 1,0 eingestellt. Dabei werden die säurelabilen Steroidkonjugate hydrolysiert. Die 20-Ketosteroide werden dann mit einem Butanol-Chlorophormgemisch (1:10) extrahiert, mit Ammoniumsulfat, Natriumsulfat und Natriumcarbonat gereinigt und das Extraktionsmittel abgedampft. Nach vollständiger Eintrocknung des Trockenrückstandes über Phosphorpentoxid im Exsikator, erfolgt dessen Lösung in Tetrachlorkohlenstoff und dann Zugabe von 2 ml eines Glycerin-Puffergemisches von pH = 7,3. 4 ml Cyclohexan, die hinzugegeben werden, erleichtern den Übergang der Steroide in die Glycerinphase. Cyclohexan und Tetrachlorkohlenstoff werden nach gutem Schütteln und Trennung der Phasen abgesaugt.

In 1 ml des Glycerin-Puffergemisches werden die 20-Ketosteroide dann bei 366 mμ photometrisch bestimmt. Coferment bei der von 5 μl der 20ß-STDH (es wird hierbei das Präparat 20ß-STDH Boehringer verwendet) katalysierten Reduktion der 20-Ketogruppe zur 20ß-Hydroxydgruppe ist NADH + H^+. Dessen Oxidation zu NAD^+ ist durch den damit verbundenen Extinktionsabfall ein Maß für die 20-Ketosteroide, die bei der Reaktion reduziert werden.

In der Medizinischen Klinik Tübingen werden die 20-Ketosteroide im Harn nach dieser Methode bestimmt.

Die Berechnung erfolgt dabei nach folgender Formel; Ausscheidung in γ/Tag. (γ/d):

$$\gamma/d = \frac{\Delta E \times 0{,}303 \times 10^3 \times 2{,}025 \times 0{,}362 \times \text{Tagesmenge an Urin}}{5}$$

Erklärung:
Der molare Extinktionskoeffizient von $NADH+H^+$ bei 366 mμ ist $\varepsilon = 3{,}3 \cdot 10^6$ cm^2/Mol
$\frac{1}{\varepsilon} = 0{,}303 \cdot 10^{-6}$ Mol/cm^2,
auf n Mol bezogen $\frac{1}{\varepsilon} = 0{,}303 \cdot 10^3$ n Mol/cm^2
2,025 ist der Verdünnungsfaktor.
Als mittleres Molekulargewicht der 20-Ketosteroide wird das Molekulargewicht von Cortisol (F) genommen = 362,5 g
1 n Mol Cortisol $\hat{=}$ 0,362 γ Cortisol
0,362 γ /n Mol ist also der Umrechnungsfaktor
(1 n Mol Cortisol $\hat{=}$ 1 n Mol $NADH+H^+$ bei äquimolarem Substratumsatz).
5 im Nenner sind die 5 ml Urin im Ansatz.
Normalwerte der Methode: 1100 - 3500 γ/d = 1,1 - 3,5 mg/d.

bε) Ermittlung von ΔE.
Margraf misst in Abständen von 5 min. so lange, bis bei 3 aufeinanderfolgenden Messungen kein Abfall mehr auftritt. Die Differenz dieser Extinktion zu der bei Zugabe der 20ß-STDH ergibt die Extinktionsdifferenz Δ E.
In Praxi ergibt sich daraus eine extrem lange Messdauer, da der Abfall der Kurve praktisch nie aufhört. Daher wird in der Tübinger Klinik etwas anders verfahren, wenngleich nach demselben Prinzip. Die Messdauer mit dem an den Photometer gekoppelten automatischen Schreiber beträgt 50 Minuten nach Zugabe des Enzyms. (= Startpunkt der Reaktion) Vor Enzymzugabe sollte möglichst nach 15 bis 20 Minuten Vorlauf kein Extinktionsabfall mehr auftreten. Die drei Extinktionswerte E bei 30 Minuten, 40 Minuten und 50 Minuten müssen auf einer Linearen liegen. Diese Linie wird bis zum Startpunkt

verlängert. Dort lässt sich dann aus der Differenz der beiden Extinktionen, die Extinktionsdifferenz ΔE ermitteln.
Diese Methode der Bestimmung von ΔE, ist etwas subjektiv und nicht sehr genau, da es sehr darauf ankommt, wie die Tangente an die Kurve in den drei Extinktionswerten bei 30, 40 und 50 Minuten angelegt wird. Es geschieht dies meist mit einem Lineal.

Im Idealfall verläuft die Extinktionskurve nach 30 Minuten als Gerade. In Wirklichkeit handelt es sich aber um eine exponentielle Funktion erster Ordnung, deren Krümmung allerdings so gering ist, dass der Fehler kaum über 5 % liegt, wenn man annimmt, es handle sich um einen linearen Abfall [30].

Für den im folgenden beschriebenen Versuch soll nun ein anderer Weg der Bestimmung von ΔE eingeschlagen werden, der erheblich genauer ist; allerdings von der gleichen Annahme des linearen Abfalls der Extinktion nach 30 Min. ausgeht.

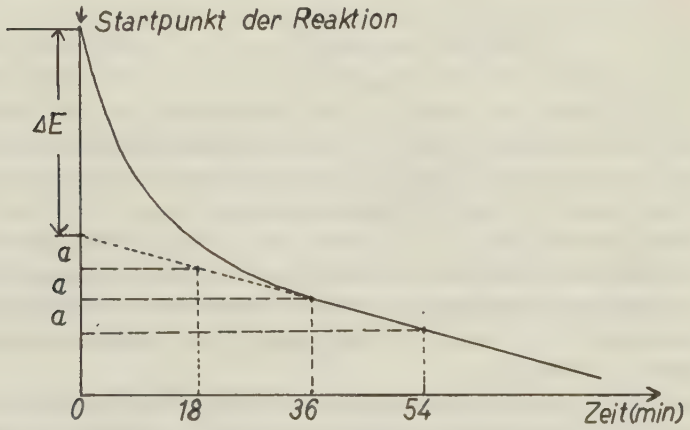


Abbildung 1: Verlauf der Extinktionskurve

In Abbildung 1 ergibt hypothetisches Anlegen einer Tangente an den linearen Abfall bei deren Schnittpunkt mit der Ordinate, die durch den Startpunkt der Reaktion (= Zugabe von 20ß-STDH) gehen soll, die Extinktionsdifferenz ΔE. Parallelen zur Abszisse, die die Tangente in 18 Minuten, 36 Minuten und 54 Minuten schneiden, ergeben auf der Ordinate die gleich langen Abschnitte a. Daraus ergibt sich eine Berechnungsmöglichkeit von ΔE:

$$\Delta E = \Sigma \Delta E_{0-36\,min} - 2 \times \Sigma \Delta E_{36\,min-54\,min}.$$

Hierbei sind nur noch 3 Messpunkte notwendig, nämlich bei 0,36 und 54 Minuten, deren Ablesung mit viel grösserer Genauigkeit erfolgen kann, als das Anlegen einer Tangente gleichzeitig an drei Punkte einer nicht ganz linearen Kurve (was ja im Prinzip gar nicht möglich ist).
Es muss aber betont werden, dass der methodische Fehler, der sich daraus ergibt, dass der Abfall nicht linear sondern exponentiell verläuft, nicht beseitigt wird. Es wird lediglich der subjektive Messfehler verkleinert.

c) Kinetik der enzymatischen Reaktion mit der 20ß-STDH

Wie schon erwähnt, spielen sterische Änderungen am Molekül und auch Substitution am Ring der Steroide eine wesentliche Rolle bei der Umsetzgeschwindigkeit der 20ß-STDH [26]. Schon Margraf et al. [27] geben bei ihrer Methode eine unterschiedliche Wiederfindung für die einzelnen Steroidmetaboliten an. Bei B, F, THF, E, THE je 100 %, bei 11-dehydrocorticosteron 70 %, bei 11-desoxycortisol 65 % und bei 11-desoxycorticosteron 10 %.
Daher sollen die wichtigsten im Urin vorhandenen 20-Ketosteroide als Reinsubstanzen unter möglichst optimalen Bedingungen auf ihr Verhalten während der enzymatischen Reaktion geprüft werden.

Anstatt Urin wird deshalb eine 0,1 molare TRA-Pufferlösung pH = 7,3 verwendet. (TRA = Triäthanolamin Boehringer Mannheim). Dessen Konzentration ist so gering, dass sehr wahrscheinlich keine Störung des Enzyms während der Reaktion auftritt.

Die Zusammensetzung des Ansatzes ist also folgende:

1 ml 0,1 molare TRA-Pufferlösung pH = 7,3
1 ml Glycerin (doppelte destilliertes Glycerin 1,23 Merck)
20 µl $NADH+H^+$ - Lösung (10 mg $NADH+H^+$ - Dinatriumsalz Boehringer in 1 ml 3 % Natriumbicarbonatlösung).
10 µl alkoholische Lösung der Reinsubstanz (diese Lösung ist ein in absolutem Äthanol aufgelöstes synthetisches Präparat von Ikapharm, Israel) in einer Konzentration von 100 mg %, das entspricht 10 γ Reinsubstanz in 10 µl Äthanol. Es wird hier Äthanol als Lösungsmittel verwendet, da Hübner et al. Äthylalkohol als geeignetes Lösungsmittel der Steroide für den optischen Test empfehlen [23].

Nach 20 Min Vorlauf im Photometer zur Herstellung des Reaktionsgleichgewichts werden 5 µl 20ß-STDH Boehringer zugegeben. Es werden die Substanzen THF, F, allo THF, THE, E, THB, allo THB, B mit je 10 Ansätzen geprüft.

Folgende Kurven (Abbildungen 2-5) ergeben sich dabei, in denen die Extinktionsdifferenzen Δ E pro 3 Minuten mit den Standardabweichungen $S = \pm \sqrt{\frac{\Sigma x^2 - \bar{x}\Sigma x}{n-1}}$ aufgetragen sind.
Die Aufzeichnung von Δ E alle 3 Minuten erfolgt aus apparatetechnischen Gründen (es wurde ein Eppendorf-Photometer mit Wechselautomat verwendet).

Aus den Kurven ist zu ersehen, dass die Extinktion von F, allo THF, THE, E nach 30 Minuten nicht mehr abfällt. Die Reaktion 20 Ketosteroide ⟶ 20ß-Hydroxysteroide ist al-

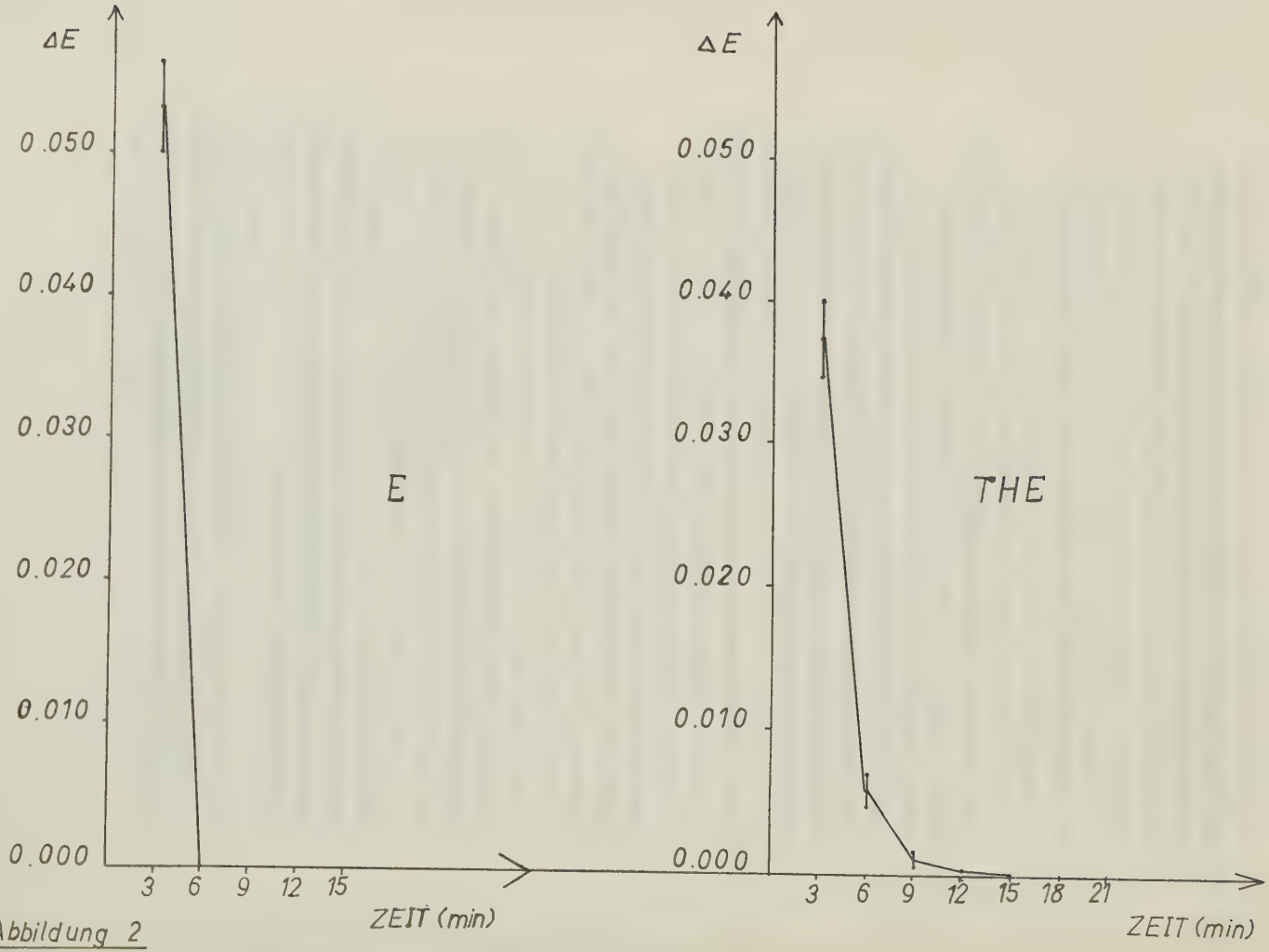

ΔE
0.050
0.040
0.030
0.020
0.010
0.000
E
3 6 9 12 15
ZEIT (min)
ΔE
0.050
0.040
0.030
0.020
0.010
0.000
THE
3 6 9 12 15 18 21
ZEIT (min)

Abbildung 2

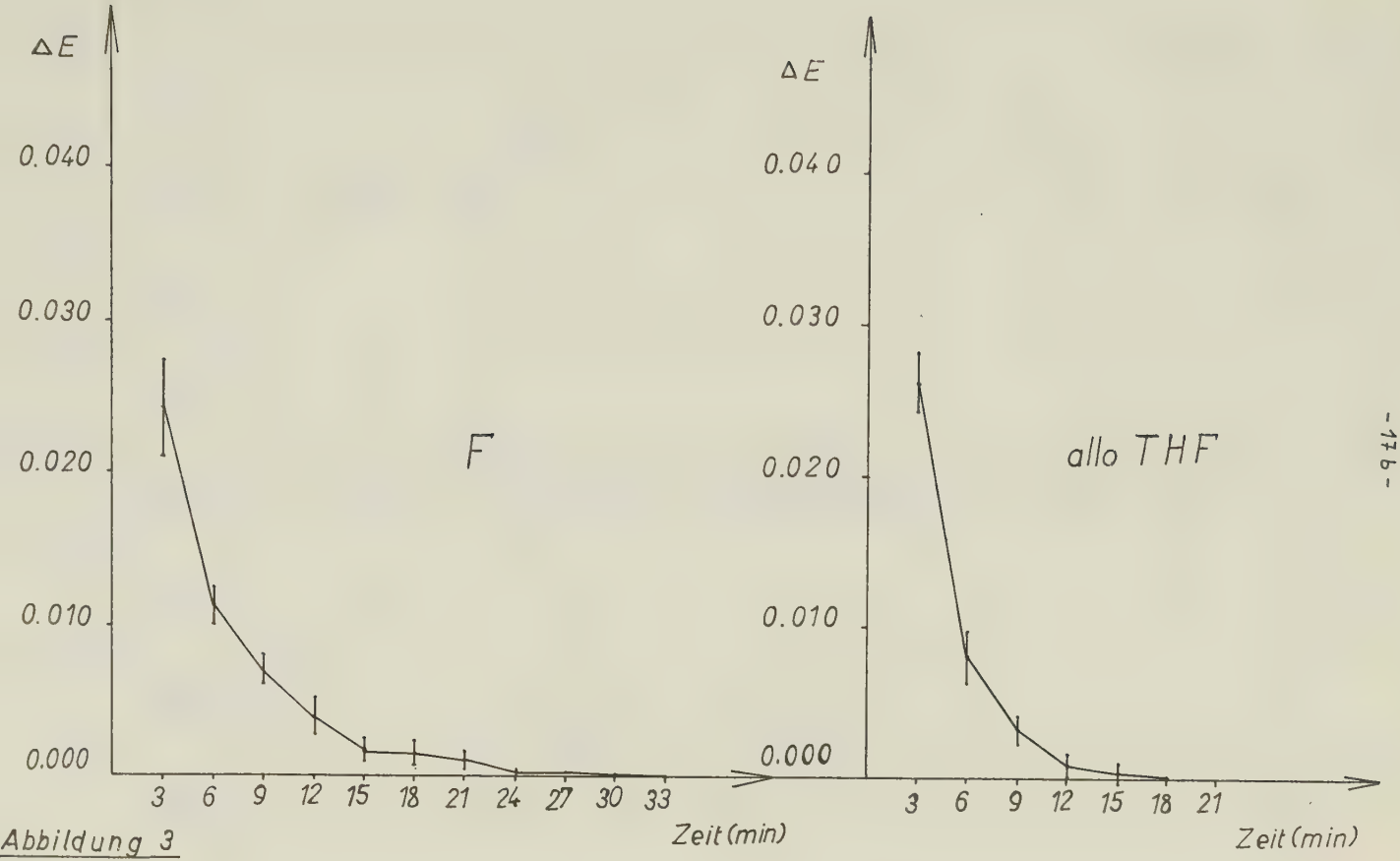

ΔE
0.040
0.030
0.020
0.010
0.000
F
3 6 9 12 15 18 21 24 27 30 33
Zeit (min)
ΔE
0.040
0.030
0.020
0.010
0.000
allo THF
3 6 9 12 15 18 21
Zeit (min)

Abbildung 3

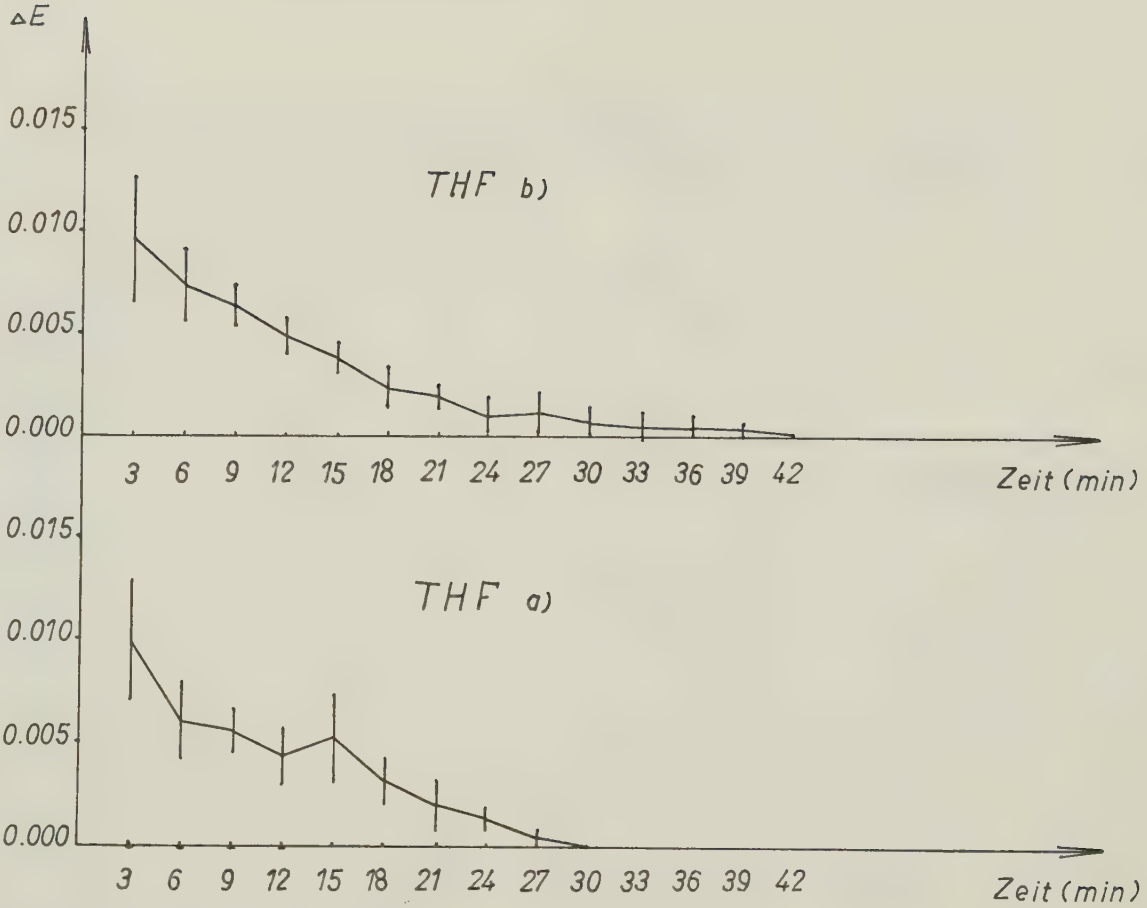

ΔE
0.015
0.010
0.005
0.000
THF b)
3 6 9 12 15 18 21 24 27 30 33 36 39 42
Zeit (min)
0.015
0.010
0.005
0.000
THF a)
3 6 9 12 15 18 21 24 27 30 33 36 39 42
Zeit (min)

Abbildung 4

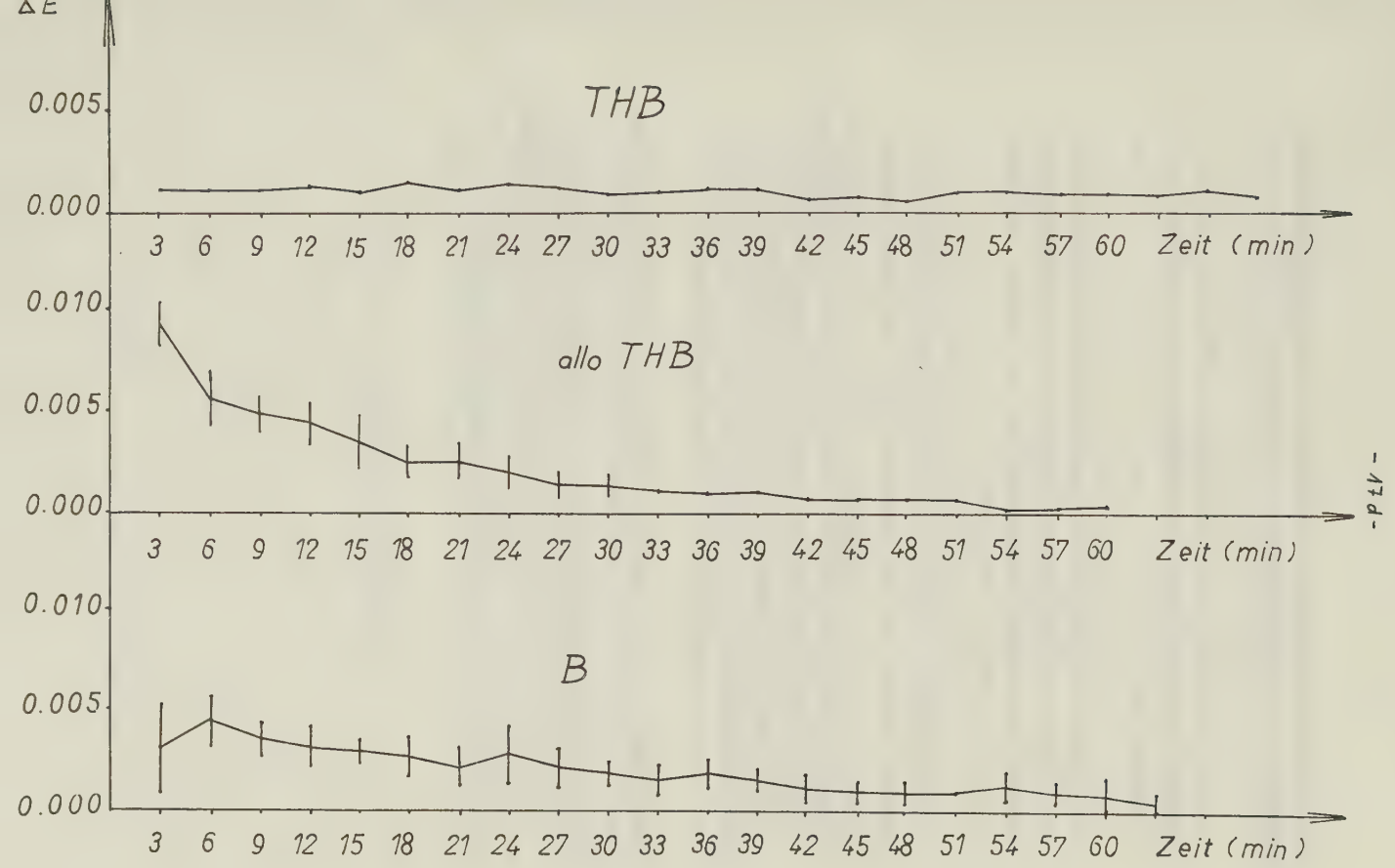

ΔE
0.005
0.000
THB
3 6 9 12 15 18 21 24 27 30 33 36 39 42 45 48 51 54 57 60 Zeit (min)
0.010
0.005
0.000
allo THB
3 6 9 12 15 18 21 24 27 30 33 36 39 42 45 48 51 54 57 60 Zeit (min)
0.010
0.005
0.000
B
3 6 9 12 15 18 21 24 27 30 33 36 39 42 45 48 51 54 57 60 Zeit (min)

Abbildung 5

so bei diesen Metaboliten nach 30 Minuten abgelaufen; bei THE und E schon nach 15 bzw. 6 Minuten.

Bei THF dauert es teilweise bis zu 36 Minuten, bis 42 Minuten fallen nur noch zwei Ansätze um $\Delta E = 0.001$ pro 3 Minuten ab.

Die Substanzen der Corticosteronreihe, allo THB und vor allem B und THB zeigen über lange Zeit einen nahezu konstanten Abfall der Extinktion, der fast linear ist, d.h. die Extinktionsdifferenz ist gleich.

Bei allo THB ist die Reaktion nach 60 Minuten fast abgelaufen, während sie bei B und THB weit über eine Stunde hinaus andauert. Im allgemeinen wurde nur eine Stunde lang gemessen, doch von THB, dem wichtigsten 20-Ketosteroid der Corticosteronreihe im Harn sind einige Ansätze 3 Stunden lang registriert worden. Es zeigte sich dabei, dass die Extinktionsdifferenz pro 3 Minuten nach 3 Stunden nur um ein geringes kleiner war, als nach einer Stunde.

Wenn man mit der Formel $\Delta E = \Sigma \Delta E_{0\text{-}36min} - 2 \times \Sigma \Delta E_{36min\text{-}54min}$

die Extinktionsdifferenzen bei allen Ansätzen ausrechnet, die Mittelwerte und die Standardabweichungen $S = \pm \sqrt{\frac{\Sigma x^2 - \bar{x} \Sigma x}{n-1}}$

berechnet, so ergeben sich die Werte in Tabelle 2.

Hormon	Anzahl der Versuche	Mittelwerte	Standardabweichung	Standardabweichung in %
THF a)	10	0,042	± 0,002	± 4,77
b)	10	0,041	± 0,004	± 9,75
F	11	0,051	± 0,005	± 9,8
allo · THF	10	0,039	± 0,0036	± 9,25
THE	10	0,044	± 0,002	± 4,55
E	10	0,052	± 0,005	± 9,62
B	10	0,019	± 0,002	± 10,5
allo · THB	10	0,031	± 0,0035	± 11,3
THB	8	0,005	± 0,002	± 40

Tabelle 2: Mittelwerte und Standardabweichungen der Extinktionsdifferenzen bei den einzelnen Metaboliten.

Da THF mit das wichtigste 20-Ketosteroid im Harn ist (siehe Tabelle 1), sind hier, wie auch schon bei den Kurven, zwei Versuchsreihen aufgestellt und 2 mal Reinsubstanzen abgewogen worden. Die Unterschiede zwischen beiden ergeben sich durch Ungenauigkeiten beim Abwiegen.

Die theoretisch zu erwartenden Extinktionsdifferenzen werden mit der Formel nach Hübener et al.[28] berechnet. Nur mit dem Unterschied, dass der Ansatz hier nicht 5 ml Urin sondern 1 ml Pufferlösung und der Verdünnungsfaktor 2,035 beträgt. (Flüssigkeitsmenge in der Küvette 2,035 ml). Die eingesetzte Menge ist 10 γ Reinsubstanz. Daraus ergibt sich folgende Formel:

$$\Delta E = \frac{10}{0{,}303 \times 2{,}035 \times \text{Molekulargewicht}}$$

Hormon	Molgewicht	Δ E theoretisch	
THF	366,5	0,0442	$\sim$ 0,044
F	362,4	0,0447	$\sim$ 0,045
allo THF	366,5	0,0442	$\sim$ 0,044
THE	364,5	0,0446	$\sim$ 0,045
E	360,4	0,0451	$\sim$ 0,045
B	346,4	0,0467	$\sim$ 0,047
allo THB	350,5	0,0463	$\sim$ 0,046
THB	350,5	0,0463	$\sim$ 0,046

Tabelle 3: *Theoretische Extinktionsdifferenzen, Molekulargewichte aus Rauen (41)*

Hormon	Mittelwert von ΔE	ΔE theoretisch	% Δ E von ΔE theoretisch
THF a)	0.042	0.044	95,5
b)	0.041	0.044	93
F	0.051	0.045	113
allo THF	0.039	0.044	88,5
THE	0.044	0.045	98
E	0.052	0.045	115
B	0.019	0.047	40
allo THB	0.031	0.046	67,5
THB	0.005	0.046	10,9

Tabelle 4: *Angabe der gefundenen Mittelwerte der Extinktionsdifferenzen bei den Reinsubstanzen in Prozent von der theoretischen Extinktion (Δ E theoretisch = 100 %)*

Die aus mathematischen Gründen vorgenommene Bestimmung von Δ E bis 36 Minuten erweist sich als sehr sinnvoll, denn es hat sich gezeigt, dass man mit der Berechnung von Δ E nach der angegebenen Formel alle Metaboliten aus der Cortison- und Cortisolreihe sicher erfassen kann, da bei ihnen nach 36 Minuten die Reaktion abgelaufen ist.

Aus der Reihe der Corticosterone erfasst man aber nur einen Teil, im Durchschnitt 67 % des allo THB, 40 % von B und 11 % von THB.

Da B und alloTHB nur in ganz geringen Mengen im Urin vorkommen, kann man sagen, dass man bei der angegebenen Berechnungsmethode im Durchschnitt nur etwas mehr als 11 % der Abbauprodukte des Corticosterons erfasst.

Bei einem Gemisch aller Substanzen, wie das im Harn der Fall ist, rührt also der Abfall der Extinktion nach 36 Minunten im wesentlichen von THB her und zu einem geringen Teil von B, allo THB und einigen anderen, in geringen Mengen vorhandenen Steroidmetaboliten. Es erfolgt aber auch ein unspezifischer Verbrauch von $NADH+H^+$ durch andere Aktivitäten, die das Enzym enthält, die andere Substanzen in der Urinprobe langsam mitreagieren lassen und durch die gewisse Unspezifität der 20ß-STDH gegenüber einigen Steroiden ohne 20-Ketogruppe (siehe J. Schmidt-Thomé [26]). Der fast lineare Abfall von THB zeigt auch, dass die Annahme eines linearen Abfalls, die zur Berechnung von Δ E nötig war, keinen grossen Fehler beinhaltet.

Die Wechselzahl bei den Corticosteronderivaten ist erheblich geringer, als bei den Cortisonderivaten. Da aber auch andere Reinsubstanzen nicht alle eine Extinktionsdifferenz von 100 % von der errechneten theoretischen Extinktionsdifferenz haben, so vor allem F, E und alloTHF, ist anzunehmen, dass trotz peinlichster Genauigkeit beim Abwiegen und Pipettieren methodische Fehler noch hinzukommen.

d) Zusammenfassung

Schwierigkeitsgrad und Zeitaufwand bestimmen wesentlich die Brauchbarkeit einer Methode für das klinische Routinelabor, wenn die Voraussetzungen über Richtigkeit, Spezifität, Genauigkeit und Empfindlichkeit (siehe Oertel [31])

erfüllt sind.
Die erwähnten enzymatischen Methoden sind besonders geeignet diese Bedingungen zu erfüllen.

Es ist in eigenen Untersuchungen ein Verfahren zur enzymatischen Bestimmung der 20 Ketosteroide in Anlehnung an Hübener und Margraf, das alle diese Kriterien berücksichtigt, entwickelt worden und soll nun im folgenden Kapitel erörtert werden.

III. DIREKTE BESTIMMUNG DER 20 KETOSTERDIDE IM HARN MIT DER 20ß-STDH

Es liegt der Gedanke nahe, die Bestimmung der 20-Ketosteroide mit Hilfe der 20ß-STDH direkt im Urin unter Auslassung jeglicher Extraktion und Reinigung, d.h. unter grösstmöglicher Vereinfachung, nach vorheriger enzymatischer Hydrolyse der Steroidkonjugate, zu versuchen. Dabei ergeben sich mehrere Probleme, die im einzelnen besprochen werden sollen.

1.) Bedingungen für die enzymatische Hydrolyse der Steroidkonjugate

A) Prinzip

Wie schon erwähnt, wird der grösste Teil der Steroide im Harn als Glucuronide und Sulfate ausgeschieden [1, 32]. Steroidphosphate wurden erst im Blut nachgewiesen [33], im Urin spielen sie wahrscheinlich nur eine geringe Rolle [32].

Voigt [32] gibt Methoden zur getrennten Hydrolyse der Glucuronide und Sulfate an (auch der Phosphate).

Steroidsulfatase besitzt eine hohe Spezifität [34], im Gegensatz zu der wie diese ebenfalls in Lebermikrosomen nachgewiesenen Arylsulfatase [35, 38]. Die Arylsulfatase ist zur Hydrolyse von Sulfatestern besser geeignet, da diese Spezifität die Anwendung der Steroidsulfatase zur Hydrolyse der Steroidsulfate in biologischem Material einschränkt [32].

Zur kombinierten Hydrolyse von Sulfaten und Glucuroniden bietet Boehringer Mannheim ein Enzymgemisch aus ß-Glucuronidase und Arylsulfatase in einer stabilisierten Lösung an. Die Herstellung der GRD/ARS erfolgt durch Extraktion aus Helix pomatia (Weinbergschnecke).

Aa) Physikalische und chemische Eigenschaften der GRD/ARS [36]

Arylsulfatase spaltet spezifisch Schwefelsäureester von Phenolen, ß-Glucuronidase hydrolysiert aliphatische und aromatische ß-Glucuronide.
pH-Optimum von ß-Glucuronidase aus Helix pomatia pH=4,4 - 4,8; von Arylsulfatase aus Helix pomatia sind die Werte nicht bekannt.

Die Firmenvorschrift gibt weiter eine Aktivitätsbestimmung für ß-Glucuronidase bei pH = 4,5 und 38°C und für Arylsulfatase bei pH = 6,2 und 37°C an, die mit Phenolphthalein-ß-Glucuronid bzw. Phenolphthaleindisulfat erfolgt.
Die Enzymlösung ist mit Butanol bei pH = 6,0 stabilisiert.

Das Präparat hat eine Aktivität an ß-Glucuronidase von 5,2 U/ml und an Arylsulfatase von 2,6 U/ml.
Reinheitsforderungen an das Enzymgemisch [32]:
Ein universell verwendbares ß-Glucuronidasepräparat soll 100 000 Fishman Einheiten pro ml enthalten (1 Fishman-Einheit ist die Enzymmenge, die bei pH = 4,5 µg Phenolphthalein aus Phenolphthalein-ß-Glucuronid in einer Stunde freisetzt).
Arylsulfatase soll 50 000 Whitehead Einheiten pro ml enthalten (1 Whitehead-Einheit ist die Enzymmenge, die bei pH = 6,2 1µg Phenolphthalein aus Phenolphthaleindisulfat in einer Stunde freisetzt).

B) Versuche

a) Allgemeines

Eine schonende quantitative Hydrolyse ohne Artefaktbildung, wie sie mit diesem Enzymgemisch möglich ist, ist die Bedingung für die quantitative Reduktion der 20-Ketosteroide zu den 20ß-Hydroxysteroiden mit der 20ß-STDH, zumal dieses

Enzym nicht mit an C 21 veresterten Steoriden reagiert [27]. Es gilt nun, die Menge an GRD/ARS zu ermitteln, die die 5 ml Urinmenge im Ansatz möglichst weitgehend hydrolysiert. Ausserdem müssen die pH-Werte bestimmt werden, bei denen dieses Enzymgemisch GRD/ARS sein Optimum hat.

Die Inkubationstemperatur beträgt 37°C ([36] und z.B. [3], [4], [32]). Um eine möglichst weitgehende Hydrolyse zu erreichen, soll 24 Stunden lang inkubiert werden.

Die Bestimmung der 20-Ketosteroide soll nach erfolgter Hydrolyse mit der Methode nach Margraf et al. geschehen, die Ermittlung von Δ E nach dem auf S. 14 beschriebenen Verfahren, das in Tübingen verwendet wird.

b) Durchführung der Versuche

Bei den in Tabelle 5 gezeigten Versuchen werden verschiedene Hydrolysebedingungen angewandt.

Nr. der Urine	a	b	c	d	e	f
I	0.034	0.130	0.144	0.046	0.056	0.031
II	0.160	0.207	0.294	0.075	0.181	0.046
III	0.055	0.219	0.227	0.050	0.058	0.030
IV	0.068	0.139	-	0.055	0,070	0,025
V	0,018	0.060	0.091	0.023	0.035	0.010
VI	0.065	0.258	0.235	0.052	0.091	0.026
VII	0.060	0.055	0.152	0.042	0.065	0.025
VIII	0.063	0.246	0.228	0.040	0.065	0.023
IX	0.042	0.118	0.135	0.026	0.049	0.010
X	0.062	0.168	0.202	0.045	0.086	0.014
XI	0.100	0.360	0.358	-	0.117	0.034
XII	0.152	-	0.443	0.098	0.115	0.028
XIII	0.053	0.125	0.158	0.030	0.052	0.010
XIV	0.122	0.510	0.475	0.093	-	0.016
XV	0.062	0.165	0.203	0.047	0.065	0.022
XVI	0.059	0.150	0.082	0.056	0.070	0.020

Tabelle 5: Verschiedene Hydrolysebedingungen, Angaben in Einheiten Δ E

Nr. der Urine	a	b	c	d	e	f
I	2,4	9,4	10,4	3,3	4,0	2,3
II	5,8	7,5	10,6	2,7	6,5	1,7
III	1,5	5,9	6,1	1,3	1,6	0,8
IV	2,7	5,6	-	2,2	2,8	1,0
V	0,9	3,0	4,5	1,1	1,7	0,5
VI	3,2	12,8	11,7	2,6	4,5	2,2
VII	2,0	1,8	5,0	1,4	2,1	0,8
VIII	3,4	13,3	12,3	2,2	3,5	1,2
IX	2,6	7,5	8,5	1,6	3,1	0,6
X	1,4	3,8	4,6	1,0	1,9	0,3
XI	4,1	14,6	14,5	-	4,7	1,4
XII	4,1	-	12,0	2,7	3,1	1,2
XIII	4,3	10,1	12,8	3,4	4,2	0,8
XIV	4,4	18,4	17,1	3,4	-	0,6
XV	1,4	3,7	4,6	1,1	1,5	0,5
XVI	3,2	9,5	5,2	3,5	4,3	1,3

Tabelle 6: Gleiche Versuche
Angabe in mg/d (Berechnung nach der Formel auf S. 14

Erklärung:

a) Übliche Säurehydrolyse nach Margraf et al. mit 40 % Schwefelsäure bei pH = 1,0

b) Inkubation mit 10 µl GRD/ARS. 24 Stunden lang pH = 6,2, dann 24 Stunden lang pH = 4,5 bei 37°C. Das Einstellen der pH-Werte erfolgt mit 5 n Natronlauge und 40 % Schwefelsäure.

c) 10 µl GRD/ARS 24 Stunden lang bei pH = 5,5 und 37°C

d) 10 µl ß-Glucuronidase (Ketodase von Gödecke) 24 Stunden lang bei pH = 4,5 und 37°C

e) 10 µl ß-Glucuronidase 24 Stunden lang bei pH = 4,5 und 37°C, dann Säurehydrolyse nach Margraf et al. wie bei a).

f) Keine Säurehydrolyse, keine Inkubation mit Enzymen.

zu b) muss erwähnt werden, dass sich die pH-Werte bei Inkubation mit pH = 6,2 häufig in den alkalischen Bereich hinein veränderten, bis pH = 9. Selbst bei Kontrolle nach 12 Stunden und Neueinstellung wurden einzelne Urine wieder alkalisch. Sie rochen dabei deutlich nach Ammoniak. So wurde ab Versuch V zuerst 24 Stunden lang bei pH = 4,5 und dann 24 Stunden lang bei pH = 6,2 inkubiert. Durch die anfängliche Ansäuerung bis auf pH = 4,5 wurden wahrscheinlich die ammoniakbildenden Keime soweit unterdrückt, dass die Urine während der darauffolgenden Inkubation bei pH = 6,2 nicht mehr alkalisch wurden.

Während der Inkubation bei pH = 5,5 in c) sind die pH-Werte immer konstant geblieben.

Diskussion:
Es zeigt sich deutlich, dass 10 μl ß-Glucuronidase sicher nicht ausreichend ist für eine weitgehende Hydrolyse ; d) ergibt sogar noch geringere Werte als die reine Säurehydrolyse bei a). Einen grossen Teil der zusätzlich zu den säurelabilen Konjugaten erfassten Glucuronide ergibt die Differenz zwischen e) - a).

Die deutlich höheren Werte für das Enzymgemisch GRD/ARS sprechen dafür, dass diese Enzyme die beste der aufgeführten Hydrolysebedingungen darstellen.

Bei den so gewählten Bedingungen ergeben b) und c) ähnlich hohe Werte, wobei es scheint, dass c), dessen pH-Wert als Mittel zwischen den beiden pH-Optima der Enzyme genommen wurde, noch etwas höhere Ausbeuten bringt.

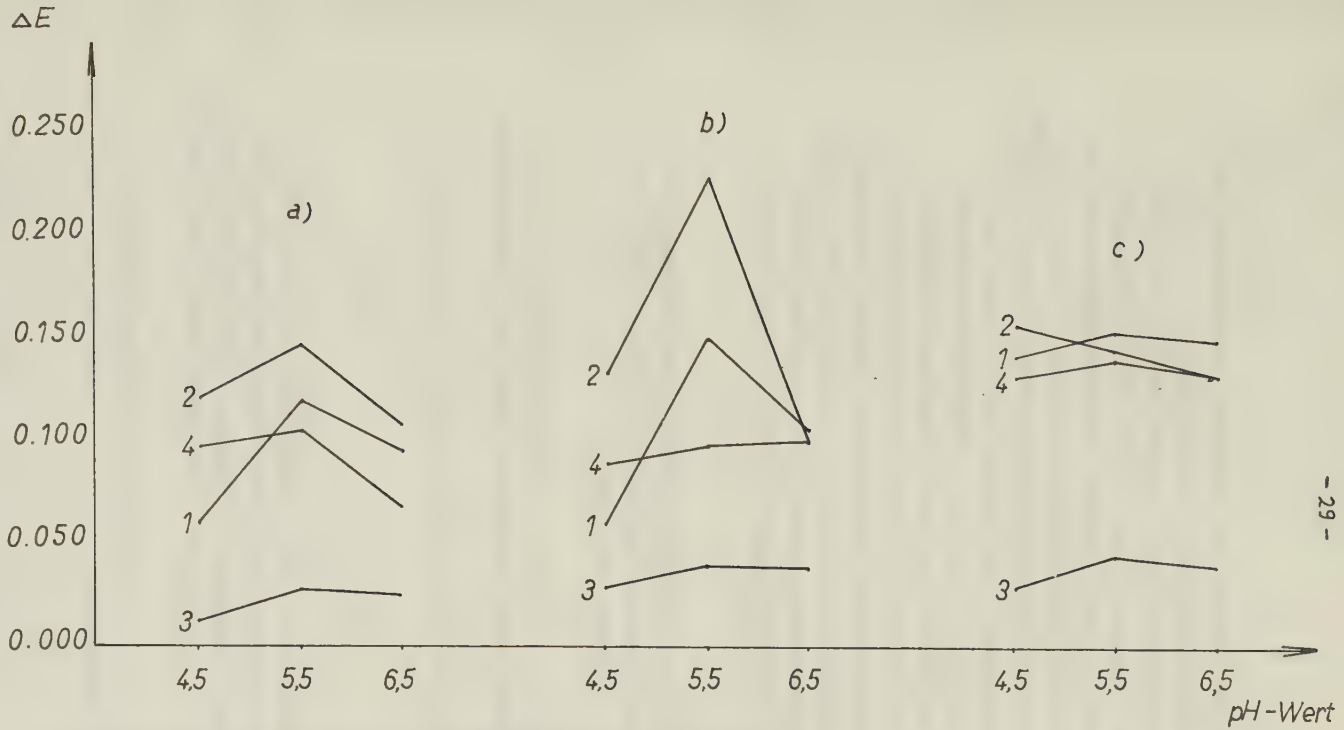
Es muss nun geprüft werden, ob der zwischen den beiden

optimalen pH-Werten gelegene mittlere pH-Wert von pH = 5,5 tatsächlich die gleiche Ausbeute an hydrolysierten 20-Ketosteroiden ergibt. Dies würde eine wesentliche Vereinfachung der Inkubation bedeuten.

Bei den folgenden Versuchen wurden die pH-Werte mit verdünnter (20%) Essigsäure eingestellt. Durch die schwächere Säure können grössere Mengen zum Titrieren verwendet werden, was die Genauigkeit steigert. Die Einstellung von pH = 6,2 wurde anfangs mit dem schwach basischen Natriumacetat durchgeführt, um eine Puffermischung zu erzielen. Dabei wurden aber bis zu 8 Spatelspitzen benötigt, so dass später 5n- Natronlauge verwendet wurde, um die Ionenkonzentration, die u.U. die enzymatische Reaktion stören könnte, möglichst niedrig zu halten.

Es zeigte sich später, dass die eigene Pufferkapazität der Urine so gross ist, dass die pH-Werte bei 24 stündiger Inkubation konstant bleiben, so dass kein zusätzlicher Puffer benötigt wird.

Abbildung 6 zeigt Versuche mit verschiednen pH-Werten bei unterschiedlicher Hydrolyse. Bei a, b, c werden immer die gleichen Urine verwendet.



Verschiedene pH-Werte bei unterschiedlicher Hydrolyse.
Inkubation: 24 Stunden lang bei 37°C.
Hydrolyse mit: a) 200 µl β-Glucuronidase
b) 200 µl β-Glucuronidase + Säurehydrolyse mit 40% H_2SO_4 bei pH = 1,0
c) 10 µl GRD/ARS

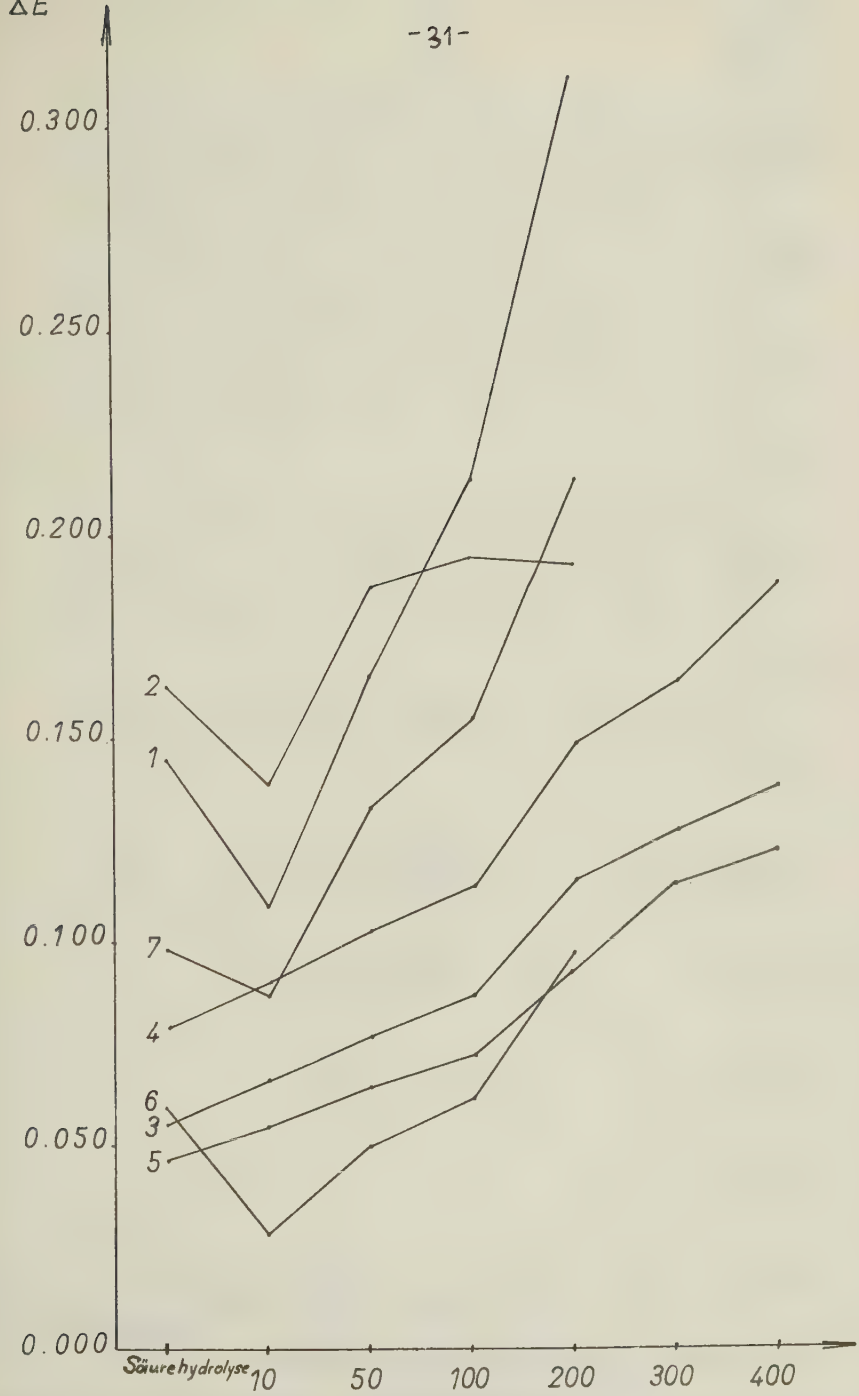
Abbildung 6

Diskussion:
Das Gemisch von GRD/ARS ist gegenüber verschiedenen pH-Werten offensichtlich recht unempfindlich, da sich die Ausbeute bei pH = 4,5, pH = 5,5 und pH = 6,5 nicht wesentlich unterscheidet. Dies erklärt vielleicht auch die sehr unterschiedlichen pH-Werte in der Literatur für die Hydrolyse mit der Arylsulfatase. Dogson [37] arbeitet mit pH = 5,5 und gibt ein Aktivitätsmaximum bei pH = 7,2 an [38]. Seine Arylsulfatase stammt ebenfalls aus Schnecken. Es fällt ausserdem auf, dass das ß-Glucuronidasepräparat (Ketodase von Gödecke) bei pH=5,5 grössere Ausbeuten bringt als bei pH = 4,5, dem für die ß-Glucuronidase der GRD/ARS (von Boehringer) angegebenen Optimum. Zumindest arbeitet die Ketodase bei pH = 5,5 nicht schlechter. Auch für die ß-Glucuronidase sind in der Literatur die verschiedensten pH-Werte angegeben, von pH 4,0 bis pH 6,5 [3), 4), 32), 37), 39)].

Bei diesen Versuchen sind erheblich grössere Mengen an ß-Glucuronidase verwandt worden als vorher; 200 µl anstatt 10 µl Ketodase (Gödecke).

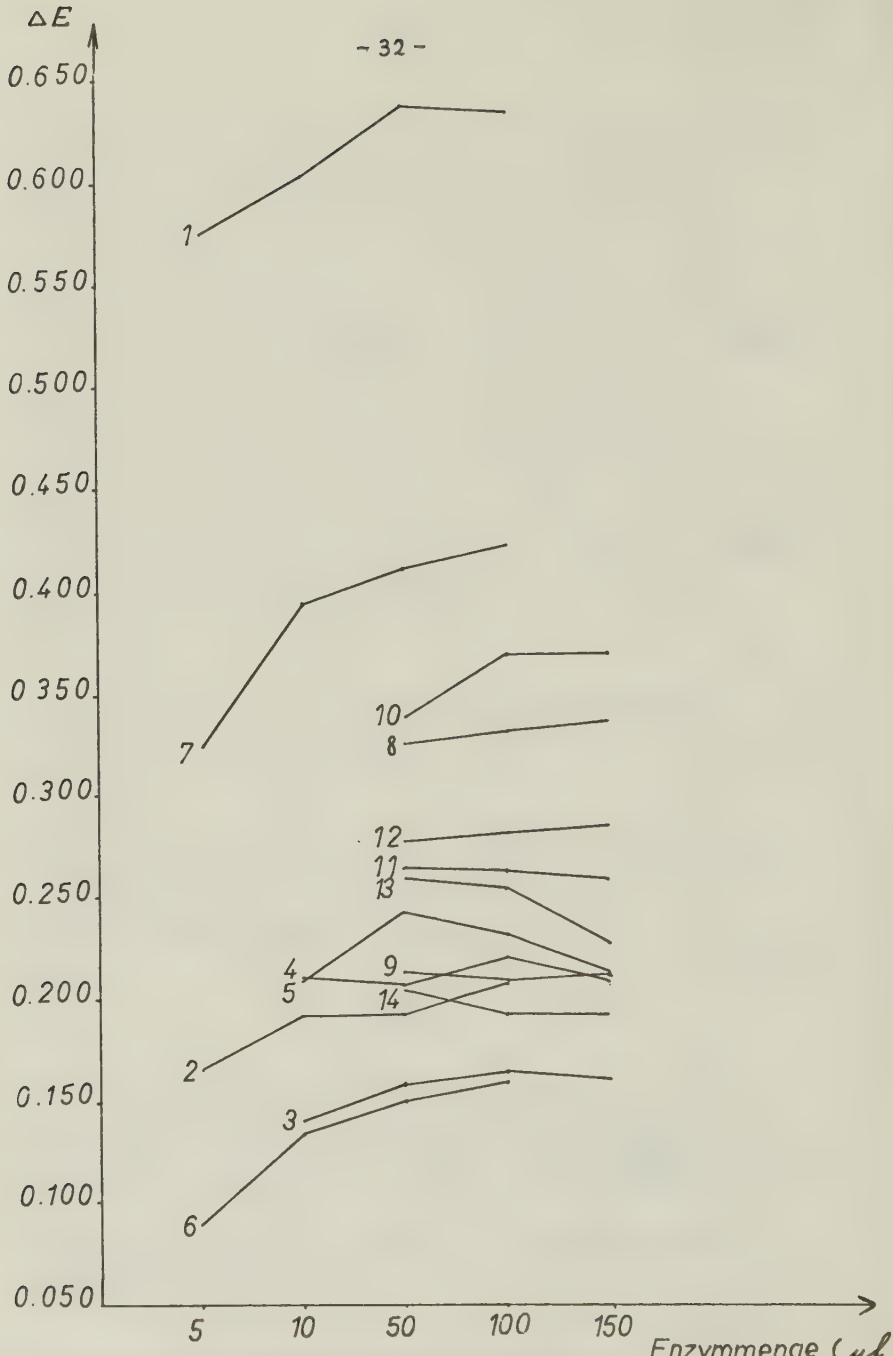
Die Versuche in Abbildung 7 sollen zeigen, dass die Ausbeute tatsächlich mit zunehmender Menge an ß-Glucuronidase ansteigt.
Es wurde hier 24 Stunden lang bei pH = 4,5 und 37°C inkubiert.

Da das Enzymgemisch GRD/ARS auch ß-Glucuronidase enthält, ist es wahrscheinlich, dass die bei den Versuchen in Tabellen 5 und 6 eingesetzte Menge von 10 µl GRD/ARS nicht ausreicht, um eine möglichst umfassende Hydrolyse zu erzielen.
Abbildung 8 zeigt nun Versuche mit steigenden Mengen an GRD/ARS zur Hydrolyse.



ydrolyse mit steigender Menge an β-Glucuronidase

bildung 7



Hydrolyse mit steigenden Mengen an GRD/ARS
(Erklärung im Text)

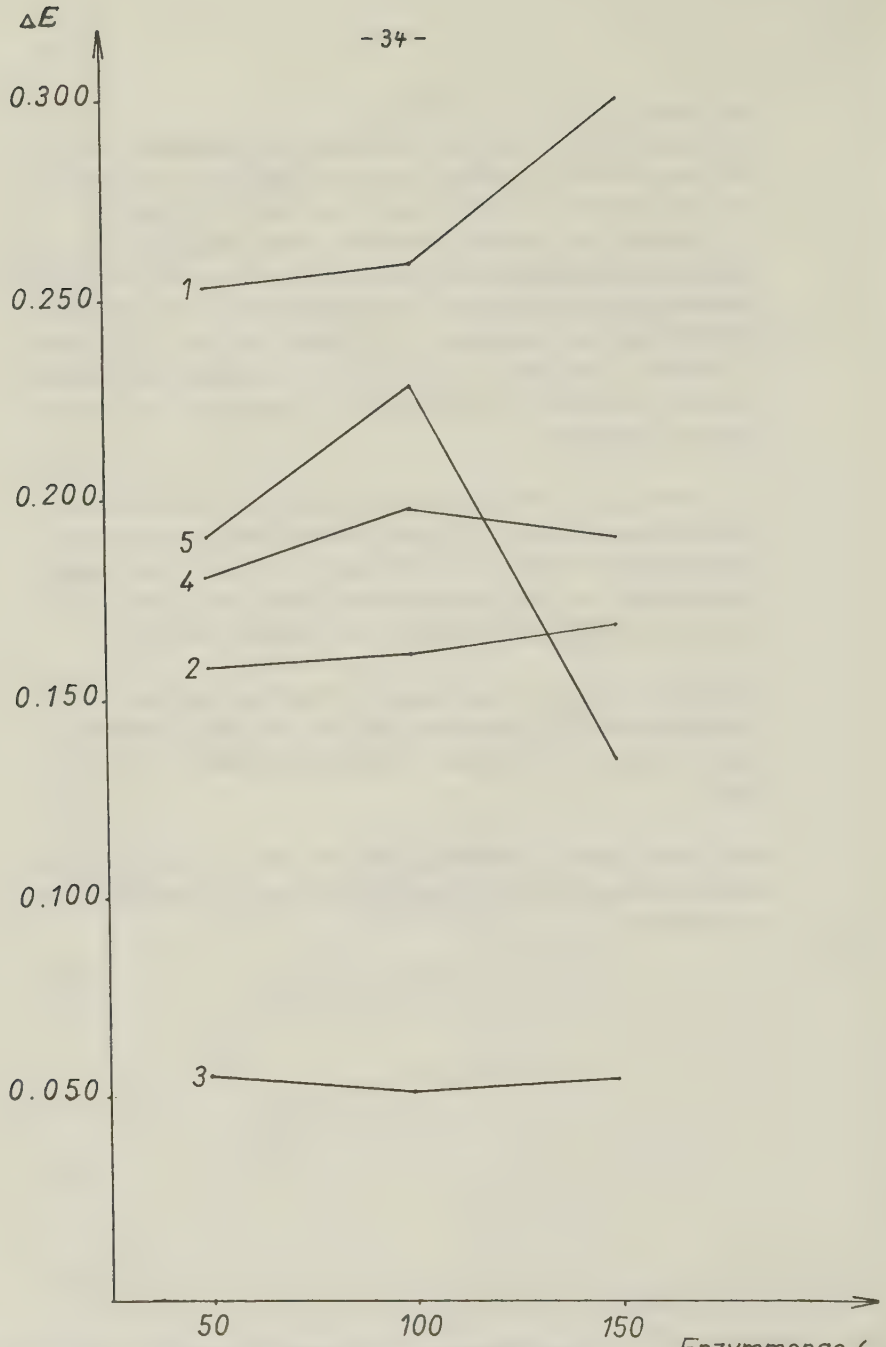
Abbildung 8

Erklärung:
Bei Urin 1 bis 5 sind die Inkubationsbedingungen: 24 Stunden lang pH = 6,2, dann 24 Stunden lang pH = 4,5 bei 37°C. Da der pH-Wert bei Urin 1 und 2 auf pH = 7,0 bzw. pH = 7,5 während der ersten 24 Stunden stieg und sich auch nach mehrmaligem Neueinstellen immer wieder in den alkalischen Bereich hinein veränderte, wurden ab Urin 6 die Inkubationsbedingungen geändert: 24 Stunden lang pH = 4,5 dann 24 Stunden lang pH = 6,2 bei 37°C. Es zeigte sich dabei, dass so die pH-Werte während der 48-stündigen Inkubation konstant blieben.

Die Ausbeute an 20-Ketosteroiden steigt offensichtlich bis zu einer Zugabe von 50 µl GRD/ARS und bleibt von da an ungefähr konstant. Deshalb wurde ab Urin 8 nur noch nachgeprüft, ob die Ausbeute bei einer Zugabe von mehr als 50 µl GRD/ARS im wesentlichen gleich bleibt.

Wie den Kurven zu entnehmen ist, benötigt man also zur Hydrolyse der 5 ml Urin tatsächlich nur 50 µl GRD/ARS. Die Versuche in Abbildung 9 veranschaulichen das ebenfalls.

Hier wurde aber 24 Stunden lang bei pH = 5,5 und 37°C inkubiert, denn das Bestreben geht dahin, die Hydrolyse zu vereinfachen.



Hydrolyse mit steigenden Mengen an GRD/ARS

Inkubationsbedingungen: 24 Stunden lang bei 37°C und pH = 5,5

Abbildung 9

Es gilt nun nachzuweisen, dass die Ausbeute bei vereinfachter Hydrolyse - 24 Stunden bei pH = 5,5 - gleich hoch ist wie bei der etwas umständlicheren Hydrolyse - 24 Stunden lang pH = 4,5, dann 24 Stunden lang pH = 6,2.

Tabelle 7 zeigt Versuche mit diesen Hydrolysebedingungen. Es wurden Doppelwerte gemacht, um die Sicherheit zu steigern und Zufallsergebnisse möglichst auszuschalten. Die Enzymmenge ist 50 μl für die 5 ml Urin im Ansatz, da es sich gezeigt hat, dass diese Menge ausreicht.

Nr. der Urine	a)	b)
1	0,228 0,217	0,210 0,217
2	0,177 0,181	0,160 0,141
3	0,140 0,158	0,121 0,124
4	0,055 0,050	0,030 0,029
5	0,129 0,124	0,096 0,095
6	0,279 0,282	0,249 0,258
7	0,209 0,206	0,180 0,178
8	0,122 0,119	0,117 0,114
9	0,419 0,442	0,419 0,422

Tabelle 7: Verschiedene Hydrolysebedingungen (mit Doppelwerten)
a) 50 μl GRD/ARS 24 Stunden lang pH = 5,5 bei 37°C
b) 50 μl GRD/ARS 24 Stunden lang pH = 4,5 dann 24 Stunden lang pH = 6,2 bei 37°C

Diskussion:
Die Werte bei a) sind etwas höher als bei b) oder aber gleich. Da a) nicht kleiner ist als b), ist es möglich, auf das komplizierte Hydrolyseverfahren von b) zu verzichten.

Es muss angenommen werden, dass der Zeitfaktor eine gewisse Rolle bei den höheren Werten von a) spielt, da hier nur 24 Stunden lang inkubiert wurde, im Gegensatz zu 48 Stunden bei b).

Zur Einstellung der Urine auf pH = 5,5 wurden verschiedene organische und anorganische Puffersysteme versucht. So Citratpuffer nach Sörensen, Phthalatpuffer nach Sörensen und ein Puffer aus Dinatriumhydrogenphosphat und Kaliumdihydrogenphosphat. Auch die Zugabe von 5 ml Puffer auf 5 ml Urin, konnten mit keinem Puffersystem alle untersuchten Urine auf pH = 5,5 gebracht werden.
Es bleibt also nichts anderes übrig, als die pH-Werte mit einem pH-Meter einzustellen. Nach einiger Übung geht das schnell und genau. Es werden nur sehr geringe Mengen an 5 n Natronlauge oder 20 % Essigsäure benötigt, bis zu 40 µl . Daher empfiehlt sich die Verwendung von sehr feinen Pipetten.

Es muss erwähnt werden, dass bei pH = 5,5 sich kein pH-Wert während der 24 stündigen Inkubation von selbst veränderte.

c) Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Versuche haben gezeigt, dass bei einer pH-Einstellung mit verdünnter Essigsäure (20 %) bzw. 5 n Natronlauge auf pH = 5,5 und einer 24 stündigen Inkubation mit 50 µl GRD/ARS bei 37°C die beste Ausbeute an 20-Ketosteroiden in den 5 ml Urin des Ansatzes erreicht wird.

2.) Vereinfachung der Extraktionsmethode nach Margraf et al [27] durch die direkte Bestimmung der 20-Ketosteroide im Harn

A) Prinzip

Nach erfolgter enzymatischer Hydrolyse soll nunversucht werden, die 20-Ketosteroide direkt im Urin zu bestimmen.

Bedingung ist, dass die vielfältigsten im Urin vorhandenen Substanzen die enzymatische Reaktion nicht wesentlich stören.Ausserdem muss der Urin klar sein. Trübungen irgendwelcher Art machen die photometrische Messung unmöglich.

Zusätzlich müssen die in dem wässrigen Urin bei der Hydrolyse anfallenden lipophilen Steroide mit Hilfe eines Lösungsmittels zur nachfolgenden Bestimmung gelöst werden. Dazu soll doppelt destilliertes Glycerin 1,23 (Merck) genommen werden, da Hübener et al.[28] für ihre Methode Glycerin verwenden. Er gibt an, dass der in Äthanol (was sonst als Lösungsvermittler in Frage gekommen wäre, da es auch als Lösungsmittel für die Reinsubstanzen gedient hat) aufgenommene Rückstand, wenn er in Wasser eingeführt wird, eine Trübung verursacht, die den Test stört. Bei Glycerin tritt keine Trübung auf.

Auch Margraf et al.[27] verwenden in ihrer Methode Glycerin (siehe auch Beschreibung ihrer Methode). Es beeinträchtigt weder den Ablauf der enzymatischen Reaktion noch die molare Extinktion von $NADH+H^+$ [28].

Wenn die 20-Ketosteroide direkt im Urin bestimmt werden sollen, so muss zweckmässigerweise der Lösungsvermittler Glycerin schon vor Beginn der Hydrolyse zugesetzt werden, damit die anfallenden hydrophoben Steroide gleichmässig im Ansatz verteilt bleiben. Ein Verhältnis wässrige Phase (= Urin) : Glycerin = 1 : 1 ist zur optimalen Lösung der Steroide geeignet.

Nach Einstellen des für die 20ß-STDH optimalen pH-Wertes von pH = 7,3, möglichst mit Hilfe einer Pufferlösung, könnte dann die photometrische Messung direkt im Urin erfolgen.

B) Eigene Untersuchungen

a) Versuche

Nach der vollendeten Hydrolyse hat das Urin-Glyceringemisch einen pH-Wert von pH = 5,5. Um es auf pH = 7,3 zu bringen, wurde ein anorganischer Phosphatpuffer (Dinatriumhydrogenphosphat und Kaliumdihydrogenphosphat pH = 7,3) verwandt. Dies gelang aber bei keinem der untersuchten Ansätze, auch nicht bei einem Verhältnis Urin-Glyceringemisch: Pufferlösung von 2 : 1.

Die hier für das Eppendorf-Photometer verwandten Eppendorf Küvetten fassen nur 3,2 ml. Bei dem Verhältnis von 2 : 1 zwischen Urin-Glycerinlösung und Puffer ist somit maximal 1 ml Urin in der Küvette, in der die 20-Ketosteroide bestimmt werden. Dies ist aber die geringste Menge, die noch einen gut ablesbaren Extinktionsabfall ergibt. Das bedeutet, dass nicht mehr als 1 ml Pufferlösung in die Küvette zugegeben werden kann.

Es wurde dann Triäthanolaminhydrochloridpuffer (TRA Boehringer Mannheim) in aufsteigender Konzentration angewandt. Erst mit 1 ml einer 1 molaren TRA-Pufferlösung konnte man die Urine auf pH = 7, 1 bis pH = 7,2 einstellen, pH = 7,3 wurde nicht erreicht.

Nach Zugabe von 20 μl $NADH+H^+$-Lösung (10 mg $NADH_2$-Dinatriumsalz Boehringer in 1 ml 3 % Natriumbicarbonatlösung) wurde in verschiedenen Ansätzen photometrisch der Gehalt an 20-Ketosteroiden ermittelt: Zugabe von 5 μl 20ß-STDH-

Lösung Boehringer nach 20 Minuten Verlauf im Photometer, Ermittlung von Δ E nach der Formel:

$$\Delta E = \Sigma \Delta E_{0-36\,min} - 2 \times \Sigma \Delta E_{36\,min - 54\,min.}$$

und Berechnung unter Verwendung eines anderen Verdünnungsfaktors, bei dem die zur pH-Einstellung zugeführten Mengen an Säure bzw. Lauge berücksichtigt wurden. Dazu wurden Vergleichsversuche mit der Methode nach Margraf et al.[27] durchgeführt, modifiziert durch die hier ermittelte enzymatische Hydrolyse mit der GRD/ARS.

Tabelle 8 zeigt die Versuche. Da die Werte der Extinktionsdifferenzen nicht verglichen werden können, es liegen ganz andere Verdünnungsfaktoren vor, erfolgt die Angabe in mg Ausscheidung pro Tag, unter Berücksichtigung der täglichen Urinmenge. Berechnung nach der Formel auf S. 14.

Nr. der Urine	direkte Bestimmung im Urin	Methode nach Margraf mit vorausgehender enzymatischer Hydrolyse
1	20,61	14,74
2	12,46	9,53
3	10,52	12,31
4	5,16	5,96
5	6,63	6,09
6	7,04	4,8
7	3,35	5,09
8	16,08	21,49
9	12,04	11,42
10	12,04	4,34
11	10,24	9,67
12	6,23	7,1
13	11,95	7,56
14	4,52	3,72
15	13,06	17,49
16	21,1	30,25
17	13,57	13,03
18	22,81	23,18
19	7,03	6,76
20	9,04	9,66
21	6,03	9,19

Tabelle 8: Vergleich der direkten Bestimmung der 20-Ketosteroide im Urin (Ansätze mit TRA-Puffer) mit der Methode nach Margraf et al. und vorangehender enzymatischer Hydrolyse

Diskussion:
Es ergeben sich sehr unterschiedliche Werte mit grossen Differenzen zwischen den beiden Methoden, ohne dass dabei die Werte einer Methode immer höher liegen als die der anderen.

Durch die grosse Verdünnung waren die Extinktionsdifferenzen bei der direkten Bestimmungsmethode so gering, dass sie teilweise kaum abgelesen werden konnten.

Da die Extinktionen in allen Ansätzen sehr langsam abfielen, muss angenommen werden, dass die Enzymreaktion durch die hohe Konzentration an TRA-Molekülen zusätzlich noch gehemmt wird. Die Konzentration der Substanzen im Urin ist sehr hoch und hemmt wahrscheinlich allein schon etwas die 20ß-STDH wie dies z.B. auch bei der Arylsulfatase, allerdings in viel stärkerem Ausmaß, der Fall ist [37].

Dass die hochkonzentrierte Pufferlösung tatsächlich die Reaktion der 20ß-STDH gehemmt hat, zeigt sich in den Versuchen in Tabelle 9. Hier wurde der pH-Wert bei der direkten Bestimmungsmethode mit einem pH-Meter und 5 n Natronlauge auf pH = 7,3 eingestellt. Dies ist viel exakter als bei den Versuchen in Tabelle 8, da mit der Pufferlösung nur pH = 7,2 erreicht wurde. Ausserdem hat die zugegebene Natronlauge eine geringere Konzentration als der hochkonzentrierte TRA-Puffer.

Die Angabe erfolgt in mg Ausscheidung pro Tag. Bei der Berechnung wurde die minimale Änderung des Verdünnungsfaktors durch die Zugabe von Essigsäure und Natronlauge zur Einstellung des pH-Werts berücksichtigt. Ermittlung von Δ E wie bei den vorigen Versuchen in Tabelle 8.

Nr. der Urine	a)	b)
1	7,13	12,54
2	13,15	15,67
3	10,0	13,99
4	11,33	15,85
5	21,18	27,12
6	4,86	9,09
7	9,68	8,29
8	5,53	7,13
9	7,05	7,89
10	17,19	25,23
11	37,63	37,28
12	15,60	14,51
13	3,43	6,72
14	4,17	12,9
15	13,0	16,53
16	9,65	10,77
17	5,04	17,02
18	22,19	37,6
19	1,64	3,76
20	2,45	4,12
21	5,86	14,58

Tabelle 9: Vergleich der direkten Bestimmungsmethode (Ansätze ohne TRA-Puffer) mit der Methode nach Margraf et al. und vorausgehender enzymatischer Hydrolyse. (Angabe in mg/d)

a) Methode nach Margraf mit vorheriger enzymatischer Hydrolyse
b) direkte Bestimmungsmethode

Diskussion:
Wie bei den Versuchen in Tabelle 8 sind die Unterschiede zwischen den beiden Methoden teilweise sehr gross. Die Differenz ist bei einem P von $< 0{,}01$ stark signifikant.

Hier fallen aber die Extinktionen im Gegensatz zu den vorigen Versuchen deutlich exponentiell ab, im Prinzip so wie bei den Versuchen mit den Reinsubstanzen (9). Ausserdem sieht man, dass die direkte Bestimmungsmethode - mit drei Ausnahmen - immer deutlich höhere Werte ergibt. Bei den drei Ausnahmen ist die negative Differenz aber sehr gering; höchstens 1,39 mg.

Offensichtlich werden bei der direkten Bestimmung mehr 20-

Ketosteroide erfasst, als bei der relativ langwierigen Extraktion nach Margraf et al. Allerdings ist die Mehrausbeute bei den einzelnen Urinen ganz unterschiedlich. Dies könnte mit dem unterschiedlichen Gehalt der Urine an den einzelnen Metaboliten aus der Gruppe der 20-Ketosteroide zusammenhängen, deren Reaktion mit der 20ß-STDH durch die hohe Konzentration an Substanzen im Harn u.U. verschieden stark gehemmt wird.

Bei diesen Versuchen hat sich auch gezeigt, dass die pH-Werte während der Messung im Photometer konstant blieben. Die Pufferkapazität des Urins selbst ist demnach ausreichend gross, um die eingestellten pH-Werte während einiger Zeit konstant zu halten.

Die häufig beobachtete Trübung der Urine konnte bei allen Versuchen durch scharfes Zentrifugieren beseitigt werden. Teilweise trat auch während der Inkubation im Brutschrank eine Trübung der Ansätze auf.Sie konnte ebenfalls durch Zentrifugation vor der Photometrie ausgeschaltet werden.

Es hat sich als zweckmässig erwiesen, nicht nur 1 ml Urin zur Hydrolyse zu inkubieren (natürlich mit der entsprechend geringeren Menge an GRD/ARS : 10 µl auf 1 ml Urin). Am besten bleibt man bei 5 ml Urin im Ansatz,wie bei der Methode nach Margraf et al.[27], denn je grösser die Urinmengen sind, desto leichter kann ein Einstellen der pH-Werte erfolgen. Ein Manipulieren mit kleinsten Flüssigkeitsmengen zur Fixierung des pH-Werts ist trotz Verwendung von Marburg Pipetten ziemlich schwierig.

Prinzipiell hat sich gezeigt, dass man die 20-Ketosteroide direkt im Harn bestimmen kann.

Unter Berücksichtigung aller gefundenen Ergebnisse ergibt sich so eine Möglichkeit der direkten Bestimmung der 20-Ketosteroide im Harn, die eine wesentliche Vereinfachung gegenüber den üblichen Methoden erbringt.

b) Beschreibung der Methode:

Zuerst wird der zu bestimmende Urin 10 Minuten lang scharf zentrifugiert, um alle groben Bestandteile (Zellen, Kristalle) und eventuell auch kolloidale Partikel zu sedimentieren.

Von dem Überstand werden 5 ml in ein Schliffgläschen abpipettiert.
Dann erfolgt das Einstellen von pH = 5,5 mit verdünnter Essigsäure (bei deneigenen Versuchen wurde 20 % Essigsäure verwandt) bzw. 5 n Natronlauge. Ist der pH-Wert sehr viel grösser als pH = 5,5, so empfiehlt es sich, konzentrierte Essigsäure zu verwenden, um die zugeführte Flüssigkeitsmenge möglichst klein zu halten. Die Konzentration der Lauge muss mindestens so hoch sein, da sonst zuviel Flüssigkeit zugegeben werden muss. Zur Einstellung der pH-Werte benötigt man ein pH-Meter mit Glaselektrode.

Als Lösungsvermittler wird nun 5 ml doppelt destilliertes Glycerin 1,23 (Merck) hinzugefügt. (Verhältnis Urin:Glycerin = 1 : 1). Eventuell noch vorhandene Trübungen werden durch die Verdünnung vermindert. Ausserdem ist im verdünnten Harn die Absorption im UV-Bereich geringer. (Dies hat sich auch gezeigt bei vergleichsweiser Exposition von Urin und Urin-Glyceringemisch in den Strahlengang des Photometers).

Nun wird 50 μl GRD/ARS (Boehringer Mannheim) mit einer Marburg Pipette hinzupipettiert und der ganze Ansatz 2 bis 3 Minuten lang geschüttelt, um eine gleichmässige Verteilung zu erreichen.

Es folgt die Inkubation von 24 Stunden bei 37°C. Nach der Inkubation wird mit 5 n Natronlauge pH = 7,3 eingestellt.

Danach ist eine sofortige Aufarbeitung empfehlenswert, denn bei pH = 7,3 ändert sich der pH-Wert leichter von selbst, z.B. durch Einwirkung von Bakterien, als bei einem saureren pH-Wert.

Das Gemisch wird erneut 10 Minuten lang scharf zentrifugiert, um Trübungen, die u.U. während der Inkubationszeit entstanden sind, zu sedimentieren. In eine Eppendorf-Küvette werden nun 2 ml des Urin-Glyceringemisches abpipettiert. Dies entspricht nicht ganz 1 ml Urin, aber wie später gezeigt wird, kann die Volumenänderung durch die zugeführten Säuren, Laugen und Enzyme vernachlässigt werden.
Weiter werden noch 20 μl $NADH+H^+$ -Lösung (10 mg $NADH-H^+$-Dinatriumsalz Boehringer in 1 ml 3 % Natriumbicarbonatlösung) in die Küvette gegeben.

Es ist nötig, gut mit einem Glasstab umzurühren bis keine Schlieren mehr vorhanden sind. Kein Kunststoffstab, da u.U. dessen Auflösung in Glycerin erfolgen könnte!

Die Küvette wird dann in einen Eppendorf Photometer (oder ein anderes Fabrikat) eingebracht, der mit einem elektronischen Schreiber gekoppelt ist.

Es sollte so lange vor Zugabe der 20ß-STDH registriert werden, bis eine nahezu lineare Extinktionskurve, möglichst horizontal, erreicht wird. Da dies nicht immer gelingt, pipettiert man im allgemeinen nach 20 Minuten Vorlaufzeit die 5 μl 20ß-STDH-Lösung von Boehringer hinzu. Das Enzym muss gut mit einem Glasstab verrührt werden. Von diesem Startpunkt der Reaktion aus werden weitere 60 Minuten lang registriert.

Die Ermittlung von ΔE geschieht nach der hier schon angegebenen Formel: $\Delta E = \Sigma \Delta E_{0-36\,min} - 2 \times \Sigma \Delta E_{36-54\,min}$.

Die Berechnung der Ausscheidung erfolgt in mg pro Tag nach der Formel [28]:

$$mg/d = \frac{\Delta E \times 0{,}303 \times 10^3 \times 2{,}025 \times 0{,}362 \times \text{Tagesmenge an Urin}}{1000}$$

2,025 im Zähler ist der Verdünnungsfaktor, der sich aus der Flüssigkeitsmenge, die in der Küvette ist, ergibt (Begründung in Abschnitt e) dieses Kapitels):

2 ml Urin-Glyceringemisch
20 µl $NADH+H^+$ - Lösung
5 µl 20ß-STDH - Lösung.

c) Prüfung der Methode auf ihre Zuverlässigkeit

Die beschriebene Methode soll nun auf ihre Zuverlässigkeitskriterien hin wie sie z.B. bei Oertel [31] und bei Braunsberg [14] beschrieben sind, untersucht werden.

cα) Nachweis der Richtigkeit der Methode

Einen Einblick in die Richtigkeit einer Methode ergeben Wiederfindungsversuche.
Dabei wird die beschriebene Methode verwendet. Zusätzlich wird vor der Inkubation, vor dem Schütteln, 50 µl derselben Reinsubstanzlösung wie sie zu den Versuchen zur Kinetik der Reaktion mit der 20ß-STDH gebraucht wurden (siehe Kapitel II, Abschnitt 2 A c), hinzupipettiert. Die Lösungen haben eine Substratkonzentration von 100 mg %.

Zu jedem Ansatz gehört noch ein Urin ohne Zusatz von Reinsubstanzen, in den anstatt der Reinsubstanz 50 µl absoluter Alkohol gegeben werden. Durch die Differenz der Extinktionsdifferenzen Δ E zwischen Urin mit Zusatz und Urin ohne Zusatz von Reinsubstanzen erhält man die wiedergefundene Menge an zugegebenem Substrat.

Bei einem Teil der Hormone, wurden noch Ansätze bestimmt, bei denen die Zugabe von Reinsubstanz nach der Inkubation erfolgt. 10 µl Reinsubstanzlösung werden vor der photometrischen Messung in die Küvette pipettiert. Das soll zeigen, ob Reinsubstanz während der Inkubation verloren geht.

Die folgenden Tabellen zeigen die Wiederfindungen.

Wie schon bei den Versuchen in Kapitel II, 2, A, c über die Reaktionskinetik wurden für THF zwei Versuchsreihen mit zwei verschiedenen Reinsubstanzlösungen aufgestellt.

Hormone	Anzahl der Versuche	Mittelwerte der Wiederfindung ± Standardabweichung s
THE	18	0.042 ± 0.004
E	18	0.043 ± 0.015
THF a)	10	0.036 ± 0.015
THF b)	11	0.037 ± 0.011
F	13	0.042 ± 0.012
allo THF	13	0.036 ± 0.016
B	13	0.017 ± 0.015
allo THB	12	0.027 ± 0.010
THB	10	0.014 ± 0.014

Tabelle 10: Wiederfindung der vor der Inkubation angesetzten Reinsubstanzen. (Angabe in Einheiten)

Hormone:	1	2	3	4	5
THE	0.042±0.004	0.044±0.002	0.045	93,4	95,5
E	0.043±0.015	0.052±0.005	0.045	95,5	82,7
THF a)	0.036±0.015	0.042±0.002	0.044	82,0	85,8
THF b)	0.037±0.011	0.041±0.004	0.044	84,2	90,3
F	0.042±0.012	0.051±0.005	0.045	93,4	82,3
allo THF	0.036±0.016	0.039±0.0036	0.044	82,0	92,4
B	0.017±0.015	0.019±0.002	0.047	36,2	89,5
allo THB	0.027±0.010	0.031±0.0035	0.046	58,7	87,2
THB	0.014±0.014	0.005±0.002	0.046	30,4	280

Tabelle 11:

Angabe der Wiederfindung in Prozent von den in Tabelle 2 und Tabelle 3 angegebenen Extinktionen (Angabe in Einheiten).

1) Mittelwerte der Wiederfindung mit Standardabweichung
2) Mittelwerte der bei den Reinsubstandmessungen gefundenen Extiktionsdifferenzen ΔE mit Standardabweichungen (siehe Tabelle 2)
3) theoretisch zu erwartende Extinktionsdifferenz ΔE (siehe Tabelle 3)
4) 1) in Prozent von 3) = Mittelwerte der Wiederfindung in Prozent von der theoretisch zu erwartenden Wiederfindung
5) 1) in Prozent von 2) = Mittelwerte der Wiederfindung in Prozent von den bei den Reinsubstanzmessungen gefundenen Mittelwerten der Extinktionsdifferenzen.

Hormon	Anzahl der Versuche	Mittelwerte der Wiederfindung ± Standardabweichung S
E	10	0.042 ± 0.0135
THF a)	10	0.047 ± 0.008
F	10	0.047 ± 0.012
B	10	0.021 ± 0.015
THB	10	0.014 ± 0.010

Tabelle 12:

Wiederfindung der nach der Inkubation direkt in die Küvette gegebenen Reinsubstanzen (Angabe in Einheiten)

Diskussion der Ergebnisse:
Man sieht deutlich, dass Corticosteron und seine Derivate (B, *allo* THB, THB) nur zu einem kleinen Teil mit dieser Methode erfasst werden können. Diese Einschränkung wurde ja schon bei den Versuchen zur Kinetik der enzymatischen Reaktion mit der 20ß-STDH in Kapitel II, Abschnitt 2, A c gefunden.

Die mittleren Wiederfindungen der Substanzen aus der Cortisol- und Cortisonreihe bewegen sich zwischen 82 % und 95 % von der theoretisch zu erwartenden Wiederfindung. Die in Prozent von den mittleren Extinktionsdifferenzen bei den Reinsubstanzmessungen (bei denen ja für die 20ß-STDH weitgehend ideale Bedingungen herrschten) angegebenen mittleren Wiederfindungen haben ungefähr dieselbe Grössenordnung (Punkt 5 in Tabelle 11).
Es ist daher anzunehmen, dass die Hemmung der enzymatischen Reaktion mit der 20ß-STDH im Durchschnitt nur mässige Ausmaße annimmt.
Es fällt aber trotzdem auf, dass die Standardabweichungen ziemlich hoch sind. Während der Inkubation geht zwar sicher ein kleiner Teil der Substanzen verloren (Differenz zwischen Mittelwerten in Tabelle 12 und 10). Die Standardabweichungen sind aber auch bei den Versuchen, bei denen die Reinsubstanzen direkt vor der photometrischen Messung in die Küvette pipettiert wurden, auffallend hoch. Bei diesen Versuchen waren noch weniger Arbeitsgänge auszuführen (z.B. nur ein Mal Pipettieren) als bei den Versuchen, bei denen die Reinsubstanzen vor der Hydrolyse zum Urinansatz zugegeben wurden. Da ungenaues Arbeiten peinlichst vermieden wurde und Reagentien und Pipetten immer wieder kontrolliert worden sind, muss auf Grund dieser hohen Standardabweichungen doch angenommen werden, dass in einzelnen Urinen Metaboliten und Abbauprodukte des Körpers irgendwelcher Art, die enzymatische Reaktion stärker hemmen als in anderen, bzw. dass unbekannte Aktivitäten im Urin eine unspezifische Oxidation des zugesetzten $NADH+H^+$ verursachen,

durch langsame Mitreaktion von anderen Substanzen.Der Mechanismus solcher hemmenden und aktivierenden Vorgänge kann im einzelnen nicht differenziert werden. Es ist aber auch denkbar, dass einzelne Pharmaka, die im Urin ausgeschieden werden, die Reaktion der 20ß-STDH beeinflussen. Bei der colorimetrischen Porter-Silber Reaktion sind diese teils additiven, teils subtraktiven Effekte durch α-Methyl-Dopa, Tranquilizer, Diuretika und verschiedene, nicht Barbiturate enthaltende Schlafmittel bekannt (Borushek [40]).

cβ) Spezifität der Methode

Die Spezifität einer Methode ist bedingt durch die bei der Aufarbeitung benutzten Verfahrensschritte und die Endpunktbestimmung. Bis jetzt gibt es keinen absolut spezifischen Nachweis der 20-Ketosteroide. Auch diese Methode ist nicht absolut spezifisch. Wiederfindungsversuche beweisen nicht, dass nur die fragliche Substanz gemessen wird, obwohl die Spezifität bei einer enzymatischen Methode sehr hoch ist.

Zu einem genauen Nachweis der Spezifität einer Methode müssten die fraglichen Substanzen isoliert, kristallin rein dargestellt und unter Ausnutzung chemischer und physikalischer Eigenschaften identifiziert werden.
Das würde hier auf fast unüberwindliche Schwierigkeiten stossen, denn die Zahl der verschiedenen 20-Ketosteroide in den einzelnen Urinen ist jeweils unterschiedlich und schwer zu ermitteln. Zusätzlich handelt es sich auch teilweise um pathologische Metaboliten, wie sie bei einigen Krankheiten mit Stoffwechselstörungen ausgeschieden werden.

Trotzdem kann gesagt werden, dass die Spezifität hoch ist, da es sich bei der 20ß-STDH um ein sehr spezifisches Enzym handelt, das nur wenige unspezifische Reaktionen zeigt [26]. Da man aber kaum ganz reine Enzympräparate zur Verfügung hat, kann man sagen, dass in dem 20ß-STDH Präparat von Boehringer wahrscheinlich auch in geringem Ausmaß einige andere Enzymaktivitäten enthalten sind.

c) Genauigkeit, Wiederholbarkeit der Methode (repeatability)

Dieses Kriterium prüft man durch Doppelbestimmungen aus einer Urinportion.

Nr. der Urine	a	b
1	0.076	0.073
2	0.102	0.105
3	0.043	0.041
4	0.165	0.169
5	0.059	0.060
6	0.050	0.059
7	0.072	0.064
8	0.064	0.059
9	0.112	0.116
10	0.070	0.067
11	0.124	0.121
12	0.040	0.045
13	0.018	0.017

Tabelle 13: Doppelwerte aus einer Urinportion (Angabe in Extinktionseinheiten)

Bei einem P > 0,5 ist der Unterschied zwischen a und b nicht signifikant.

cδ) Empfindlichkeit der Methode

Die Menge eines Stoffes in der Analyse, die sich signifikant von Null unterscheidet, gibt die Empfindlichkeit der Methode an.
Die Empfindlichkeit dieser Methode ist aber wie bei allen optischen Methoden durch die Extinktionskoeffizienten der zu messenden Substanzen, in diesem Fall $NADH+H^+$, gegeben. Daraus kann die theoretische Empfindlichkeit errechnet werden.

d) Methodische Ergänzungen

An diesem relativ grossen Kollektiv von Versuchen hat sich gezeigt, dass die Zentrifugation ausreicht um alle Trübungen der Urine auszuschalten.

Ausserdem änderte sich keiner der pH-Werte während der Inkubation. Alle Urine hatten den konstanten pH-Wert von pH = 5,5. Auch nach der photometrischen Messung lagen alle pH-Werte zwischen pH 7,2 und pH 7,3. Die im Harn schon vorhandenen Pufferkapazitäten reichen also aus, den pH-Wert nach Einstellung ohne Pufferlösung über kurze Zeit konstant zu halten. Zur Sicherheit empfiehlt sich trotzdem eine rasche Aufarbeitung nach der Inkubation.

Bei sämtlichen Versuchen gingen immer wieder Ansätze verloren und zwar sämtliche Ansätze aus demselben Urin. Es trat während der photometrischen Messung entweder kein Abfall der Extinktion ein, oder dieselbe stieg an. Ursachen dafür konnten keine ermittelt werden. Hinsichtlich ihres Aussehens und der chemischen Eigenschaften schienen die Urine normal zu sein. Es ist denkbar, dass verabfolgte Medikamente die enzymatische Reaktion stören und zu diesen Erscheinungen führen [40].

Auf Grund von Schwankungen des Photometers, die bei allen benutztenGeräten mehr oder weniger auftraten und wegen der Strichdicke des Schreibers von $\Delta E = 0.002$ ist es fast unmöglich, eine Extinktionsdifferenz von $\Delta E < 0.005$ noch genau abzulesen.

e) Berücksichtigung der zur pH-Einstellung zugeführten Mengen und der Molekulargewichte der Steroide bei der Berechnung.

Die pH-Werte sämtlicher benutzter Urine lagen zwischen pH = 5,0 und pH = 9,8.

Zur Einstellung auf pH = 5,5 waren im Durchschnitt 17 µl ± 34 µl 20 % Essigsäure (bzw. konzentrierte Essigsäure bei sehr hohen pH-Werten) und 5 *n* - Natronlauge nötig; zur Einstellung auf pH = 7,3 nach der Inkubation 39 µl ± 35 µl 5 *n* - Natronlauge.

Zusammen mit den 50 µl GRD/ARS, die vor der Inkubation zur Hydrolyse der Konjugate zugegeben werden, ergibt sich so für 97 % aller Ansätze (= 2 δ -Bereich) ein zusätzliches Volumen von maximal 175 µl zu den 10 ml Urin + Glycerin in der Probe.

Umgerechnet auf die 2 ml Urin-Glyceringemisch, die nachher in die Küvette pipettiert werden, ist das eine Volumenzunahme von maximal 35 µl .

Bei den Versuchen wurde immer die Volumenveränderung bei der Ermittlung von ΔE (durch Multiplikation von ΔE mit einem jeweils errechneten Faktor) und bei der Berechnung der Ausscheidung berücksichtigt und entsprechend mehr Urin-Glyceringemisch in die Küvette einpipettiert. Die Berechnung erfolgte dann nach der Formel:

$$mg/d = \frac{\Delta E \times 0{,}303 \times 10^3 \times \text{Menge in Küvette} \times 0{,}362 \times \text{Tagesmenge i.Harn}}{1000}$$

= $\Delta E \times 0{,}303 \times$ Menge in Küvette $\times$ 0,362 $\times$ Tagesmenge im Harn. Dabei veränderte sich dann jedesmal der Verdünnungsfaktor (= Menge in der Küvette).

Bei Nichtberücksichtigung der zusätzlich zugeführten Säure-, Laugen- und Enzymmengen ergibt sich eine Menge von 2,025 ml (2 ml Urin-Glyceringemisch, 20 μl $NADH+H^+$ Lösung, 5 μl 20ß-STDH-Lösung) in der Küvette. Somit erhält man die Formel (1):

(1) $mg/d = 0{,}222 \times \Delta E \times$ Tagesmenge an Harn

Bei der maximalen Volumenzunahme von 35 μl pro 2 ml Urin-Glyceringemisch, ergibt sich ein Verdünnungsfaktor von 2,060.
Dies ergibt dann Formel (2):

(2) $mg/d = 0{,}225 \times \Delta E \times$ Tagesmenge an Harn

Es ist leicht einzusehen, dass sich die in mg/d angegebenen Ergebnisse in Formel (1) und (2) dabei nur um einige μg unterscheiden.
Eine Berücksichtigung der zugeführten Mengen an Säure, Lauge und an GRD/ARS ist also nicht nötig.

Als mittleres Molekulargewicht der 20-Ketosteroide gibt Margraf et al. [27] das Molekulargewicht von Cortisol an, obwohl dieses nur in geringen Mengen im Harn erscheint.

Tabelle 14 zeigt nun, dass die Unterschiede zwischen den Molekulargewichten der einzelnen im Harn erscheinenden Substanzen so gering sind, dass sie bei der Berechnung ebenfalls vernachlässigt werden können. Man kann deshalb sehr wohl das Molekulargewicht von Cortisol als Mittelwert zwischen den anderen Molekulargewichten zur Berechnung nehmen.

Cortisol	362,4 g
Tetrahydrocortisol	366,5 g
allo Tetrahydrocortisol	366,5 g
Cortison	360,4 g
Tetrahydrocortison	364,5 g
Corticosteron	346,4 g
Tetrahydrocorticosteron	350,5 g
allo Tetrahydrocorticosteron	350,5 g

Tabelle 14: Molekulargewichte der 20-Ketosteroide (aus Rauen (41))

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden die derzeitig verwendeten quantitativen Nachweisverfahren zur Bestimmung von C-21-Steroiden aus Körperflüssigkeiten besprochen.

Im experimentellen Teil werden die Ergebnisse einer enzymatischen Bestimmung von 20-Ketosteroiden im Harn nach einer von MARGRAF 1963 angegebenen Methode dargestellt und die einzelnen experimentellen Schritte sowie ihre chemischen Grundlagen besprochen.

Das Reaktionsgleichgewicht des gewählten Verfahrens, der Reduktion der 20-Ketosteroide mit NADH + H^+ unter dem katalytischen Einfluss einer 20-beta-Steroiddehydrogenase liegt fast ausschliesslich auf der Seite der entstehenden Produkte. Die Reaktion ist substratspezifisch, der Substratumsatz aequimolar. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist unterschiedlich für die einzelnen Substrate, sie ist für Cortison am schnellsten und dauert am längsten für Tetrahydrocorticosteron. Daraus ergeben sich praktische Konsequenzen für die Zeitnahme zur Ermittlung des spezifischen NADH + H^+ - Verbrauchs. Das gewählte Analysenverfahren zur Bestimmung der 20-Ketogruppe der C-21-Steroide erfüllt für die wichtigsten 20-Ketosteroide die geforderten Zuverlässigkeitskriterien, die durch Wiederholungsversuche und Wiederfindungsversuche geprüft wurden. Unter Berücksichtigung der für Hormonbestimmungen im Harn geforderten Regeln liess sich das Verfahren dahingehend vereinfachen, dass die Bestimmung der 20-Ketosteroide im Harn direkt möglich wurde. Empfind-

lichkeit, Wiederholbarkeit und Genauigkeit erlauben die Anwendung des Verfahrens als Screeningtest mit vergleichsweise geringem Arbeitsaufwand.

V. L I T E R A T U R A N G A B E N

1) Tamm J. Methodik, Fehlerquellen und Deutung der Corticosteroidbestimmung im Harn. Internist, der 12, (559-566) 1963

2) Fukushima, D.K., N.S. Leeds, H.L. Bradlow, T.H. Kritchevsky, M.B. Stokem, T.F.Gallagher The Characterization of Four New Metabolites of Adrenocortical Hormones. J. biolog. Chem. 212 (449-460) 1955

3) Holness N.J., J.B. Lunnon, C.H. Gray The Identification of Some Adrenocortical Steroids in Urine. J. Endocrinol. 14 (138-145) 1956

4) Porter C.C., R. H. Silber A Quantitative Color Reaction for Cortisone and Related 17, 21-Dihydroxy-20-Ketosteroids. J. biolog. Chem. 185 (201-207) 1950

5) Porter C.C., R.H. Silber The Determination of 17, 21-Dihydroxy-20-Ketosteroids in Urine and Plasma. J. biolog. Chem. 210 (923-932) 1954

6) Barton, D.H.R., T.C. Mc Morris, R. Segovia The Nature of the Porter-Silber Reaction. J. chem. Soc. 1961/2 (2027-2031)

7) Glenn E.M., D.H. Nelson Chemical Method for the Determination of 17-Hydroxycorticosteroids and 17-Ketosteroids in Urine Following Hydrolysis with ß-Glucuronidase. J. clin. Endocrin. 13 (911-921) 1953

8) Oertel G.W. Chemische Bestimmung von Steroiden im menschlichen Harn. Berlin, Göttingen, Heidelberg, Springer Verlag 1964

9) Zimmermann W. Chemische Bestimmungsmethoden von Steroidhormonen in Körperflüssigkeiten. Berlin, Göttingen, Heidelberg, Springer Verlag 1955, S. 79 ff.

10) Daughaday W.H., M. Jaffé, Ph. D. and R.H. Williams Chemical Assay for "Cortin", Determination of Formaldehyde Liberated on Oxidation with Periodic Acid. J. clin. Endocrinol. 8 (166 - 174) 1948

11) Dobriner K., S. Lieberman, C.P. Rhoads
Studies in Steroid Mettabolism
I. Methods for the Isolation and Quantitative Estimation of Neutral Steroids Present in Human Urine.
J. biolog. Chem. 172 (241-262) 1948 a
- Dobriner K., S. Lieberman, C.P. Rhoads, R.N. Jones, V.Z. Williams, R.B. Barner
Studies in Steroid Metabolism.
III. The Application of Jnfra-Red Spectrometry to the Fractionation of Urinary, Ketosteroids.
J. biolog. Chem. 172 (297-311) 1948a

12) Hübener H.J., E. Hoffmann, F. Bode
Über eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung der Nebennierenrindenhormone.
Hoppe Seyler's Z.f.physiol. Chemie 289 (102-107) 1952

13) Pearlman W.M. Recent Experiences in the Detection, Estimation and Isolation of Progesterone and Related C_{21} - Steroids
Rec. Progr. in Horm. - Research 9 (27-39) 1954

14) Braunsberg, H., V.H.T. James
The Determination of Cortisol and Corticosterone in Blood: A Review.
J. clin. Endocrinol. 21 (1146 - 1188) 1961

15) Chamberlain J., Thomas G.H.
Characterization of 20-Oxosteroids by Gaschromatography.
Anal. Biochem. 8 (104-115) 1964

16) Hübener H.J., F.G. Sahrholz
20ß-Hydroxysteroiddehydrogenase
II. Darstellung und Kristallisation.
Biochem. Z. 333 (95 - 105) 1960

17) Baillie A.H., Calman K.C., Ferguson M.M.
Histochemical Demonstration of 20ß-Hydroxysteroiddehydrogenase.
J. Endocrinol. 32/3 (337-339) 1965

18) Hübener H.J., D.K. Fukushima, T.F. Gallagher
Substrate Spezifity of Enzymes Reducing the 11- and 20-Ketogroups of Steroids.
J. biol. Chem. 220 (499-511) 1959

19) Nesemann G., H.J. Hübener, R. Junk, J. Schmidt-Thomé
20ß-Hydroxysteroiddehydrogenase.
I. Züchtung von Streptomyces hydrogenans und Induktion des Enzyms.
Biochem. Z. 333 (88-94) 1960

20) Nesemann, G., H.J. Hübener, J. Schmidt-Thomé
20ß-Hydroxysteroiddehydrogenase
IV. Einfluss der Steroidkonzentration auf die Induktion des Enzyms.
Biochem. Z. 336 (329-333) 1962

21) Lindner F., R. Junk. G. Nesemann, J. Schmidt-Thomé
Gewinnung von 20ß-Hydroxysteroiden aus 17α , 21-Dihydroxy, 20-Ketosteroiden durch mikrobiologische Hydrierung mit Streptomyces hydrogenans.
Hoppe Seyler's Z. f. physiolog. Chemie 313 (117-123) 1958

22) Hübener H.J., C.O. Lehmann
Die enzymatische 20-Ketoreduktion durch Extrakte aus Streptomyces hydrogenans.
Hoppe Seyler's Z. f. physiolog. Chemie 313 (124-129) 1958

23) Hübener H.J., F.G. Sahrholz, J. Schmidt-Thomé, G. Nesemann, R. Junk
20ß-Hydroxysteroiddehydrogenase, ein neues kristallines Enzym.
Biochem. et biophys. Acta 35 (270-272) 1959

24) Hübener H.J., J. Schmidt-Thomé
DBP 1075521 vom 18.2.1960
Farbwerke Hoechst A.G.

25) Hübener H.J. in H.U. Bergmeyer
Methoden der enzymatischen Analyse.
Weinheim, Verlag Chemie, 1962, S. 477 ff.

26) Schmidt-Thomé J., G. Nesemann, H.J. Hübener, J. Alester
20ß-Hydroxysteroiddehydrogenase
III. Substratspezifität der Oxidoreduktion und Induktion.
Biochem. Z. 336 (322-328) 1962

27) Margraf H.W., C.O. Margraf, Th. E. Weichselbaum
A Method for the Enzymatic Determination of Cortcosteroids in Extracts from Whole Blood, Plasma and Urine.
Steroids 2 (143-154) 1963

28) Hübener H.J., F.G. Sahrholz
Über eine enzymatische Analyse von Nebennierenrindenhormonen im Blutplasma.
Naturwissenschaften 46 (112-113) 1959

29) Henning H.D., J. Zander
Anwendung von Hübeners 20ß-Hydroxysteroiddehydrogenase bei der mikrochemischen Identifikation und Trennung von Steroiden.
Hoppe Seyler's Z.f.physiolog. Chemie 330 (31 - 37) 1962

30) Bergmeyer H.U. Methoden der enzymatischen Analyse.
Weinheim, Verlag Chemie 1962; S. 39 ff.

31) Oertel G.W. Chemische Bestimmung von Steroiden im menschlichen Plasma.
Berlin, Göttingen, Heidelberg, Springer Verlag 1962

32) Voigt K.D. in H.U. Bergmeyer
Methoden der enzymatischen Analyse.
Weinheim, Verlag Chemie, 1962, S. 462-476

33) Oertel G.W., K.B. Eik-Nes
Dehydroepiandrosterone in Blood
II. Isolation of Complexes from Human Blood - Plasma Containing Dehydroepiandrosterone and Phosphoric Acid.
Acta Endocrinologica 30 (93-98) 1959

34) Voigt K.D., M. Lemmer, J. Tamm
Studien zur enzymatischen Hydrolyse von Steroidsulfaten und - Phosphaten.
Biochem. Z. 331 (335-364) 1959

35) Dogson K.S., B. Spencer
Studies on Sulfatases
I. The choice of Substrate for the Assay of Ratliver Arylsulfatase.
Biochem. J. 53 (444 - 451) 1953

36) Aus der Anleitung der Firma Boehringer Mannheim zu ihrem Präparat: GRD/ARS (ß-Glycuronidase/Arylsulfatase)

37) Dogson K.S., B. Spencer
Studies on Sulfatases
IV. Arylsulfatase and ß-Glucuronidase Concentrates from Limpets.
Biochem. J. 55 (315-320) 1953

38) Dogson K.S., B. Spencer
Studies on Sulfatases
II. The Assay of the Arylsulfatase Activity of Rat Tissues.
Biochem. J. 53 (452-457) 1953

39) Hundson B., J. Sheat, Dulmanis A.
Hydrolysis of Steroid Glucuronides with β-Glucuronidase from Preputial Glands of the Female Rat.
Endocrinol. 70/2 (189-195) 1962

40) Borushek S., J.J. Gold
Commonly Used Medication that Interfere with Routine Endocrine Laboratory Procedures.
Clin. Chem. 10/1 (41 - 52) 1964

41) Rauen, H.M.
Biochemisches Taschenbuch.
Berlin, Göttingen, Heidelberg, Springer Verlag, 2. Auflage 1964, Teil 1

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. H. E. Bock für die großzügige Gewährung eines Arbeitsplatzes im Labor der Medizinischen Universitätsklinik danken, sowie Herrn Dr. R. Allner für die Überlassung des Themas und für seine allzeit geduldige Hilfestellung.

Lebenslauf

Am 21.10.1944 wurde ich, Bernd Wegler, in Stetten/Kr. Waiblingen als erstes Kind des Ass.-Arztes Dr. Siegfried Wegler und der Marianne geb. Metzger geboren.

3 1/2 Jahre Volksschule in Stuttgart-Degerloch bis 1955. Danach 9 Jahre im Wilhelmsgymnasium in Stuttgart. Abitur am 26.2.1964.

Nach Zurückstellung vom Wehrdienst Beginn des Medizinstudiums im Sommersemester 1964 in Tübingen, wo ich während der ganzen Studienzeit blieb. Vorphysikum am 1.4.1965. Physikum am 22.9.1966. Beginn der Dissertation im Frühjahr 1967 bei Professor Dr. H.E. BOCK in der Medizinischen Klinik auf dem Gebiet der Klinischen Chemie. Fertigstellung der Arbeit im Frühjahr 1969.

Das Staatsexamen nach dem 11. Hochschulsemester wurde am 5.2.1970 beendet.